

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

FACOLTA' DI SCIENZE MM.FF.NN.
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOLOGIA
APPLICATA ALLA BIOMEDICINA

AUMENTO DELL'INCIDENZA DI ANEUPLOIDIA NEI CAMPIONI DI SEME CON OLIGOASTENOZOOSPERMIA SEVERA PROVENIENTI DA PORTATORI DI RIARRANGIAMENTI CROMOSOMICI STRUTTURALI BILANCIATI

CANDIDATA:

Chiara Tempio

PRIMO RELATORE:

Prof.ssa Anna Maria Rossi

SECONDO RELATORE:

Dott. Luca Gianaroli

Anno Accademico 2014-2015

| | |
|----------------------|----------|
| PREMESSA..... | 3 |
|----------------------|----------|

CAPITOLO I

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|----------|
| INQUADRAMENTO FISIOLOGICO DELL'APPARATO RIPRODUTTIVO MASCHILE... | 5 |
|-------------------------------------------------------------------------|----------|

| | |
|--------------------------|----------|
| INTRODUZIONE..... | 6 |
|--------------------------|----------|

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Fisiologia dell'apparato riproduttivo maschile..... | 12 |
| 1.1 Spermatogenesi..... | 15 |
| 1.2 Spermatogoniogenesi (la fase mitotica della spermatogenesi)..... | 16 |
| 1.3 Spermatocitogenesi (la fase meiotica della spermatogenesi | 18 |
| 1.4 Spermiogenesi (la differenziazione degli spermatidi in spermatozoi maturi..... | 19 |
| 1.5 Struttura dello spermatozoo..... | 22 |

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| 1.2 ANOMALIE CROMOSOMICHE..... | 24 |
|---------------------------------------|-----------|

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.2.1 Meccanismi di formazione delle anomalie cromosomiche strutturali..... | 33 |
| 1.2.2 Anomalie cromosomiche numeriche..... | 34 |
| 1.2.3 Aneuploidie autosomiche..... | 37 |
| 1.2.4 Aneuploidie sessuali..... | 39 |
| 1.2.5 Meccanismi di formazione delle anomalie cromosomiche numeriche..... | 41 |
| 1.2.6 Effetto intercromosomico..... | 43 |
| 1.2.7. La tecnica FISH..... | 46 |

CAPITOLO II

| | |
|--------------------------|-----------|
| INFERTILITA'..... | 50 |
|--------------------------|-----------|

| | |
|-----------------------------------------------|----|
| 2. Infertilità e sterilità..... | 51 |
| 2.1 Stime dell'infertilità..... | 51 |
| 2.2 Quali sono le cause dell'infertilità..... | 52 |
| 2.3. Infertilità maschile..... | 52 |
| 2.4 Scopo della ricerca..... | 56 |

CAPITOLO III

| | |
|--------------------------------|-----------|
| MATERIALI E METODI..... | 58 |
|--------------------------------|-----------|

| | |
|-----------------------------------------------------|-----------|
| 3. Analisi del liquido seminale..... | 59 |
| 3.1 Campioni di seme..... | 59 |
| 3.2 Esame del liquido seminale..... | 59 |
| 3.3 Determinazione della morfologia spermatica..... | 65 |
| 3.4 Protocollo fish..... | 67 |
| 3.4.1 Preparazione dei nuclei spermatici..... | 67 |
| 3.4.2 Decondensazione dei nuclei spermatici | 68 |
| 3.4.3 Denaturazione e ibridazione..... | 69 |
| 3.4.4 Caratteristiche delle sonde..... | 70 |
| 3.4.5 Lavaggi post ibridazione..... | 73 |
| 3.4.6 Preparazione delle soluzioni..... | 74 |

| | |
|---------------------------------------|----|
| 3.4.7 Microscopio a fluorescenza..... | 75 |
| 3.4.8 Analisi statistica..... | 77 |

CAPITOLO IV

| | |
|-------------------------------------|------------|
| RISULTATI E DISCUSSIONE..... | 78 |
| 4.1 Risultati..... | 53 |
| 4.2 Discussione..... | 95 |
| 4.3 Conclusioni..... | 101 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 102 |

PREMESSA

L'internato di tesi svolto presso il laboratorio di Andrologia del centro S.I.S.Me.R (Società Italiana Studi di Medicina della Riproduzione), mi ha dato l'opportunità di apprendere le tecniche di laboratorio, sia a livello pratico che teorico. La mia attività di ricerca è stata quella di analizzare la frequenza di aneuploidia nei gameti di pazienti portatori di riarrangiamenti strutturali bilanciati con un fattore maschile severo. L'analisi delle aneuploidie e delle traslocazioni è stata effettuata mediante la tecnica FISH.

Desidero ricordare tutti coloro che mi hanno aiutato nella stesura della tesi con suggerimenti, critiche ed osservazioni: a loro va la mia gratitudine, anche se a me spetta la responsabilità per ogni errore contenuto in questa tesi.

Ringrazio anzitutto la Prof.ssa Anna Maria Rossi, Primo Relatore, il Dott. Luca Gianaroli, Secondo relatore, i Professori Roberto Scarpato e Daniele Campa, Correlatori, senza il loro supporto e la loro guida sapiente questa tesi non esisterebbe.

Ringrazio la Dott.ssa Cristina Magli che mi ha saputo ascoltare e incoraggiare in ogni momento.

Proseguo con il personale del laboratorio di Andrologia, in particolare il Dott. Andor Crippa a cui devo riconoscenza e gratitudine per avermi trasmesso con pazienza e dedizione le competenze in merito alle tecniche utilizzate per la ricerca condotta in questo studio; la Dott.ssa Francesca Muzzonigro, che mi ha formata fin dal primo giorno della mia presenza al S.I.S.Me.R e mi è stata vicina in ogni momento sapendo interpretare le mie esigenze.

Un ringraziamento particolare va ai colleghi ed agli amici che mi hanno supportato o che hanno speso parte del proprio tempo per leggere e discutere con me le bozze del lavoro.

Vorrei infine ringraziare le persone a me più care: i miei genitori e mia sorella, a cui questo lavoro è dedicato.

Capitolo I

Inquadramento fisiologico dell'apparato riproduttivo maschile

Introduzione

L'apparato genitale maschile è costituito da: testicoli (o didimo, o gonade maschile), luoghi di produzione di spermatozoi e di ormoni sessuali, accolti nei sacchi scrotali; vie spermatiche che comprendono epididimi, dotti deferenti, dotti eiaculatori, uretra, che raccolgono, convogliano, elaborano ed emettono il liquido seminale o sperma; ghiandole annesse ovvero vescichette seminali, prostata, ghiandole bulbo-uretrali, che contribuiscono alla elaborazione del liquido seminale e il pene che è l'organo della copulazione.

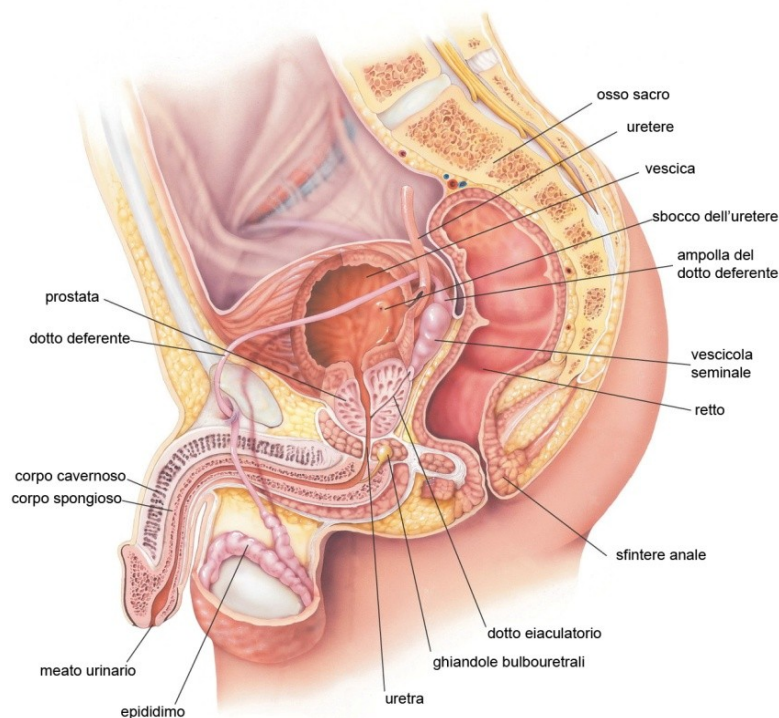


Figura 1

Il pene contiene l'uretra, il tessuto erettile, costituito da una massa spugnosa di tessuto connettivo e tessuto muscolare liscio, nervi e vasi sanguigni.

Lo scroto è una sacca cutanea formata da tessuto connettivo fibroso che racchiude le gonadi o testicoli in due compartimenti separati, destro e sinistro, divisi da un setto. Lo scroto fornisce un ambiente per i testicoli nel quale la temperatura è leggermente inferiore a quella corporea. Questa

condizione è fondamentale per la spermatogenesi (Mieusset & Bujan 1995b; Setchell 1998).

Le gonadi o testicoli sono due ghiandole ovoidali rivestite da uno strato di connettivo fibroso denso, la tonaca albuginea; dalla faccia profonda della tonaca si dipartono dei setti convergenti verso il mediastino testicolare che dividono il parenchima testicolare in logge o lobuli di forma piramidale, con la base rivolta verso la superficie del testicolo e l'apice in corrispondenza del mediastino.

All'interno di ogni lobulo sono distribuiti i tubuli seminiferi, un sistema di tubuli vuoti spiraliformi del diametro di 150-200 μm e lunghi 40-80 cm, nei

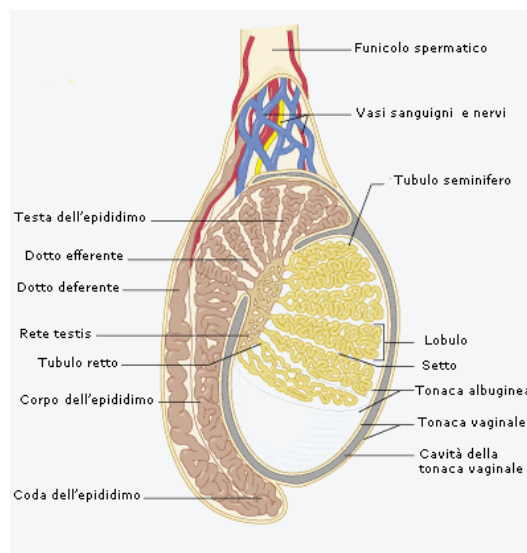


Figura 2

quali sono prodotti gli spermatozoi. I tubuli seminiferi, a loro volta, sono composti di una guaina peritubulare (lamina propria) e dall'epitelio seminifero. La guaina peritubulare (8 μm) è costituita da quattro o cinque strati di miofibroblasti contrattili e di tessuto connettivo (Figura 2). L'epitelio

seminifero (80 μm) poggia sulla membrana basale ed è costituito da 2 categorie di cellule: cellule di sostegno o di Sertoli e cellule germinali.

Le cellule di Sertoli sono cellule somatiche post-mitotiche che si estendono dalla membrana basale all'estremità del tubulo seminifero, costituendo una rete citoplasmatica ramificata che circonda le cellule germinali circostanti.

Queste cellule svolgono molteplici funzioni e in particolare favoriscono il processo di spermatogenesi (regolando il rilascio di spermatidi maturi).

Questa fitta rete di tubuli è immersa nel fluido interstiziale dove sono presenti gruppi di cellule responsabili della sintesi e secrezione degli ormoni

sessuali, diidrotestosterone (DHT) e testosterone, denominate cellule di Leydig. Le cellule di Sertoli non vengono a contatto con il fluido interstiziale poiché in prossimità della loro regione basale, le membrane laterali adiacenti sono unite saldamente da giunzioni che si estendono per tutto il loro perimetro e che formano la barriera emato-testicolare (Blood-Testis Barrier, BTB); questi complessi giunzionali sono costituiti da giunzioni serrate e comunicanti associate a filamenti di actina e alle cisterne del reticolo endoplasmatico. In conseguenza di ciò la barriera emato-testicolare suddivide l'epitelio seminifero in due compartimenti: il compartimento basale e il compartimento adluminales che affaccia verso il lume del tubulo. La presenza della barriera quindi, segrega le cellule germinali in due differenti e definiti microambienti: gli spermatogoni e gli spermatociti primari in preleptotene, nel compartimento basale; gli spermatociti in meiosi e le cellule germinali post-meiotiche, spermatidi e spermatozoi, nel compartimento adluminales. La barriera ostacola qualsiasi diffusione di fluido dall'interstizio, quindi, mentre il compartimento basale è accessibile al fluido interstiziale che origina dai vasi sanguigni, il compartimento adluminales è isolato ed è invece pervaso dal fluido tubulare che è secreto dalle cellule del Sertoli (il fluido tubulare si differenzia nettamente nella sua composizione chimica rispetto al fluido interstiziale).

La meiosi e la spermatogenesi procedono quindi in uno specifico microambiente tubolare isolato dal compartimento vascolare-interstiziale e avvengono in stretta ed esclusiva connessione con le cellule del Sertoli che riforniscono le cellule germinali di nutrienti specifici e substrati energetici quali lattato, piruvato e proteine. Fini meccanismi di regolazione sono alla base delle proprietà che caratterizzano la barriera emato-testicolare, la cui presenza è essenziale per il corretto funzionamento riproduttivo. Grazie alla permeabilità selettiva e alla dinamicità delle giunzioni che la caratterizzano, essa è in grado di impedire qualsiasi diffusione di fluido attraverso lo spazio intercellulare (Bergmann et al., 1989). Allo stesso tempo garantisce agli

spermatociti, durante la transizione tra la fase mitotica e quella meiotica, di migrare dal compartimento basale a quello adluminale: il TNF-alfa regola la dissoluzione e la formazione delle giunzioni occludenti durante la migrazione da un compartimento all'altro (Xia et al., 2009), mentre le cellule muscolari lisce, che avvolgono la membrana basale, permetteranno, attraverso contrazioni peristaltiche, di convogliare gli spermatozoi e il liquido tubolare lungo la fitta rete gonadica.

Oltre a partecipare alla costituzione della barriera-ematotesticolare e a

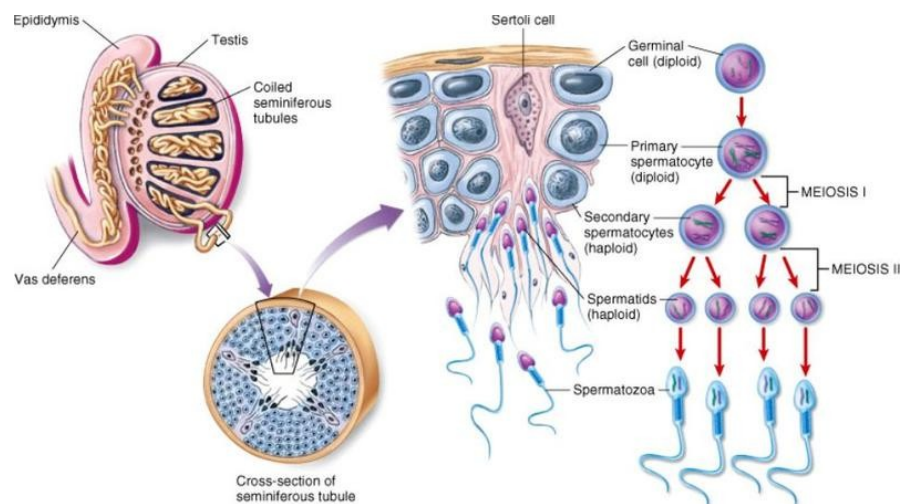


Figura 3

fornire supporto strutturale alle cellule germinali in maturazione, le cellule del Sertoli svolgono svariate altre funzioni endocrine per il raggiungimento di un corretto sviluppo spermatico tra cui:

- ✓ secrezione di fattori che regolano la spermatogenesi: fattori di crescita (stem cell factor), citochine (proteine della famiglia del TGF-alfa e beta, TNF), proteine della matrice (collagene e laminina), sostanze nutritive (amminoacidi, glicidi, lipidi, vitamine e ioni metallici);

- ✓ secrezione di fattori proteici che mediano l'azione dell'FSH (Follicle stimulating hormone) e che regolano il differenziamento e l'attività mitotica/meiotica delle cellule germinali (Böckers et al., 1994);
- ✓ secrezione di fattori che regolano la funzione delle cellule di Leydig e delle cellule peritubulari;
- ✓ rilascio di inibina B (membro della famiglia del TGF-beta) nel sangue; tale ormone regola attraverso un meccanismo feedback negativo la produzione ipofisaria di FSH e di GnRH a livello ipotalamico;
- ✓ secrezione di fluido nel lume del tubulo seminifero contorto utile allo sviluppo e al trasporto dei gameti e, al trasporto di nutrienti alle cellule germinali in via di sviluppo.
- ✓ fagocitosi del citoplasma di scarto e dei ponti citoplasmatici degli spermatidi (Chemes et al. 1986);

Le cellule di Leydig si trovano nel tessuto connettivo interstiziale, tra i tubuli seminiferi.

Esse sono responsabili della sintesi e della secrezione degli androgeni, la maggior parte dei quali è riversata nel circolo sanguigno per mezzo del quale raggiungono attraverso il legame con alcune proteine plasmatiche, come l'albumina e l'SHBG (sex hormone binding globulin) verso la quale il testosterone ha maggiore affinità, le diverse parti del corpo con la funzione di mantenere i caratteri sessuali maschili. Una frazione minore di androgeni rimane nei testicoli all'interno dei tubuli, dove viene catturata dalle ABP (androgen binding proteins, sintetizzate dalle cellule di Sertoli sotto lo stimolo dell'ormone ipofisario FSH) e trasportata all'interno dei genitali permettendo la differenziazione maschile delle componenti dell'apparato riproduttivo.

Il trasporto dei gameti avviene grazie alla convergenza dei tubuli seminiferi verso il mediastino testicolare, dove perdono l'aspetto convoluto e diventano rettilinei costituendo i tubuli retti che si anastomizzano formando

una rete, detta rete testis, dalla quale dipartono circa 15-20 condotti efferenti che confluiscono a formare l'epididimo.

L'epididimo è un organo pari a forma di virgola, posto sopra il testicolo e lungo circa 7 m. Tuttavia, essendo ripiegato su se stesso a formare piccole circonvoluzioni a spirale, occupa uno spazio di circa 5-6 cm. Il canale dell'epididimo è il tratto maggiore che i gameti devono percorrere per essere espulsi all'esterno.

È suddiviso in tre parti: la testa, posta al polo superiore del testicolo; il corpo, una parte allungata che si estende lungo il margine posteriore del testicolo; e la coda, che nella porzione inferiore del testicolo si ripiega ad ansa e si porta verso l'alto per proseguire nel dotto deferente.

Gli spermatozoi che si sono formati nel testicolo entrano nella testa dell'epididimo, avanzano verso il corpo e alla fine giungono nella regione della coda, dove sono immagazzinati. Questi spermatozoi sono incompleti, mancando della capacità di muoversi e di fecondare l'ovulo. Durante l'eiaculazione, gli spermatozoi immagazzinati nella coda dell'epididimo, sono spinti grazie all'azione peristaltica degli strati muscolari all'interno del dotto deferente.

Il dotto deferente è un dotto cilindrico molto lungo (40 cm) che penetra nella cavità pelvica e, dopo aver incrociato l'uretra, termina a formare un'ampolla dove convergono le estremità inferiori delle vescichette seminali e di altre ghiandole accessorie, come la prostata e le vescichette bulbo-uretrali. A livello dell'uretra, la ghiandola prostatica libera le sue secrezioni, che contengono acido citrico, fonte d'energia per gli spermatozoi, e molti enzimi, quali l'antigene specifico della prostata (PSA) necessario per inibire la coagulazione del seme (la sua produzione è strettamente connessa alle dimensioni della prostata). Le ghiandole bulbo-uretrali, che sono poste sotto la prostata, hanno invece la funzione di secernere un fluido viscoso, con funzione lubrificante, rilasciato prima dell'eiaculazione. Il liquido seminale, o

sperma, è dunque il risultato dell'incontro e dell'unione alle secrezioni di queste ghiandole.

I principali gruppi di sostanze contenute all'interno del liquido seminale sono ioni liberi e legati (Ca, Na, K), proteine, enzimi, poliammide, lipidi, carboidrati (fruttosio), ormoni, prostaglandine e acidi inorganici come l'acido citrico; il fruttosio costituisce il 70% del liquido seminale e rappresenta la fonte energetica degli spermatozoi (Martini Frederick H., et al. 2000-2004; Barbieri M. et al. 1989).

1. Fisiologia dell'apparato riproduttivo maschile

La funzione riproduttiva maschile è regolata dalle gonadotropine, dagli androgeni e dall'ormone che stimola il rilascio delle gonadotropine.

Le gonadotropine, l'ormone follicolo-stimolante (FSH) e l'ormone luteinizzante (LH), sono due ormoni proteici che sono secreti dal lobo anteriore dell'ipofisi o adenoipofisi ed agiscono sulle gonadi. In generale, l'FSH nella donna stimola la crescita e lo sviluppo dei follicoli ovarici e la secrezione di estrogeni, nel maschio stimola la produzione degli spermatozoi; l'LH nella donna stimola l'ovulazione, la trasformazione del follicolo in corpo luteo e la secrezione di estrogeni e progesterone, nel maschio stimola i testicoli a secernere testosterone.

La funzione principale dell'FSH nel maschio è di agire sulle cellule di Sertoli per stimolare la gametogenesi e attivare la produzione della proteina legante gli androgeni ABP. L'LH, al contrario, stimola la secrezione di androgeni da parte delle cellule di Leydig. Gli androgeni essendo steroidi, sono di natura lipofila e quindi diffondono dalle cellule di Leydig ai tessuti testicolari, incluse le cellule di Sertoli, dove funzionano come paracrini. Gli androgeni entrano anche nel torrente sanguigno, che li trasporta ai tessuti di tutto il corpo.

Nei testicoli, il testosterone agisce con l'FSH per favorire la spermatogenesi. Il testosterone promuove anche lo sviluppo e la crescita degli organi riproduttivi accessori durante la pubertà ed è necessario per il mantenimento e per la funzione continua di queste strutture nella vita adulta. Per questa ragione, una mancanza di testosterone porta a una diminuzione della dimensione degli organi accessori, della muscolatura liscia e dell'attività ghiandolare. Tale ormone è inoltre responsabile dello sviluppo e del mantenimento delle caratteristiche sessuali secondarie e agisce sul cervello per promuovere la pulsione sessuale.

L'ormone che stimola il rilascio delle gonadotropine è un ormone trofico ipotalamico che agisce sull'ipofisi dove stimola la secrezione di gonadotropine e quindi tende a promuovere la secrezione degli androgeni. Diversamente dalla maggior parte degli ormoni ipotalamici che agiscono sull'ipofisi stimolando il rilascio di un solo ormone dal lobo anteriore, il GnRH induce il rilascio di due ormoni, FSH e LH, che vengono prodotti e secreti dalle stesse cellule del lobo anteriore dell'ipofisi.

Il testosterone ed altri androgeni limitano la loro secrezione attraverso un meccanismo a feedback negativo. Nello specifico, essi agiscono sia sull'ipotalamo per sopprimere la secrezione di GnRH, sia sul lobo anteriore dell'ipofisi, rendendolo meno rispondente al GnRH. Come risultato, il testosterone tende a impedire il rilascio di FSH e LH, che a loro volta tendono a down-regolare la conseguente secrezione di testosterone. Le cellule di Sertoli secernono anche un ormone proteico chiamato inibina, che impedisce il rilascio di FSH (ma non il rilascio di LH). La secrezione degli ormoni sessuali nel maschio è abbastanza costante. Durante il periodo riproduttivo, l'ipotalamo rilascia GnRH in maniera ciclica con un picco ogni due ore circa, determinando un aumento della secrezione di FSH e LH in coincidenza con i picchi, e una loro diminuzione tra un picco e l'altro. Nonostante queste fluttuazioni, i livelli medi di FSH e LH nel plasma, e quindi il livello di testosterone, si mantengono relativamente costanti.

LEGENDA

- Centro di integrazione
- Via efferente
- Effettore
- Risposta tissutale

Il diagramma illustra il controllo ormonale della funzione testicolare. L'Ipotalamo (Centro di integrazione) rilascia GnRH, che stimola l'Ipofisi anteriore (Effettore). L'Ipofisi anteriore rilascia FSH e LH (Via efferente). FSH stimola le cellule di Sertoli e la produzione di Inibina. LH stimola le cellule di Leydig e la produzione di Testosterone (T). Il Testosterone (T) agisce su tutti gli organi per esercitare effetti secondari. I prodotti cellulari e l'ABP (proteina legante gli androgeni) sono mostrati. La risposta tissutale è indicata da un rettangolo verde.

Figura 4

L'aumento di GnRH scatena un aumento simile della secrezione di gonadotropine, che stimola a sua volta la crescita e la maturazione dei testicoli, così come la secrezione di testosterone.

Il testosterone è un ormone steroideo prodotto attraverso il processo di steroidogenesi a partire dalla conversione della molecola di colesterolo, svolge un ruolo fondamentale nella fertilità maschile poiché agisce sulla maturazione dei gameti. Inoltre esercita molteplici azioni di tipo anabolico e androgenico su diversi tessuti e apparati, come quello muscolare scheletrico, adiposo, epatico, pilifero e sebaceo. L'aumento del livello di testosterone nel plasma, che avviene durante la pubertà, stimola la maturazione del sistema riproduttivo e altri cambiamenti in tutto il corpo. Per esempio, stimola la secrezione dell'ormone della crescita da parte del lobo anteriore dell'ipofisi, che a sua volta promuove la crescita ossea causando il rilevante aumento di

statura tipico di questo periodo. Le azioni del testosterone portano anche allo sviluppo dei caratteri sessuali secondari durante la pubertà, inclusa la crescita della barba e la crescita dei peli nella regione pubica e sotto le ascelle; l'aumento della sintesi delle proteine nei muscoli, che porta ad un aumento della massa muscolare e della forza; la crescita della laringe, che porta ad avere una voce più profonda; la secrezione di sebo da parte delle ghiandole sebacee della cute. Inoltre mantiene il funzionamento degli organi sessuali e, infine, regola la produzione del liquido spermatico.

Quindi l'LH, l'FSH e il testosterone stimolano le cellule di Sertoli nei testicoli a mantenere la spermatogenesi; il testosterone controlla la fase iniziale, mentre l'FSH la fase terminale della gametogenesi. In conclusione l'avvio e il mantenimento della normale steroidogenesi gonadica e della spermatogenesi richiedono l'attivazione e l'integrità anatomico – funzionale dell'asse ipotalamo – ipofisi – gonade (William J. et al., 2006).

1.1 Spermatogenesi

La spermatogenesi è quel complesso di fenomeni differenziativi e maturativi della linea germinale, che avvengono all'interno dei tubuli seminiferi del testicolo, e che determina la formazione dello spermatozoo a partire dallo spermatogonio; ha una durata di circa 74 giorni e comprende:

- ✓ spermatogoniogenesi, la proliferazione per mitosi delle cellule germinali primitive da cui originano gli spermatociti primari;
- ✓ spermatocitogenesi, la divisione meiotica degli spermatociti primari a formare spermatociti secondari e da questi gli spermatidi;
- ✓ spermiogenesi, la differenziazione degli spermatidi in spermatozoi maturi senza fenomeni moltiplicativi;
- ✓ Spermiazione, la liberazione degli spermatozoi nel lume dei tubuli seminiferi.

Le cellule germinali primitive, migrano nelle gonadi maschili, dove compiono ripetuti cicli mitotici formando gli spermatogoni; con il progredire della crescita e del differenziamento si formano gli spermatociti primari, cellule diploidi ($2n$) che vanno incontro a meiosi che dimezza il numero del corredo cromosomico da diploide ad aploide (n).

La meiosi implica due successive divisioni cellulari, definite rispettivamente meiosi I (fase riduzionale) e meiosi II (fase equazionale), ma un unico ciclo replicativo del DNA, per cui i suoi prodotti sono aploidi.

1.2 Spermatogoniogenesi (la fase mitotica della spermatogenesi)

Nella fase mitotica, che si estende per circa 20 giorni, avviene la proliferazione e il differenziamento degli spermatogoni. Gli spermatogoni rappresentano una popolazione di cellule che, dividendosi per mitosi, dà luogo sia a una popolazione di cellule staminali spermatogoniali, che si autorinova, sia ad una popolazione di cellule germinali destinate ad entrare nella fase meiotica. La classificazione degli spermatogoni dipende essenzialmente dalle

caratteristiche

morfologiche dei loro

nuclei e soprattutto della

cromatina nucleare.

Nell'uomo sono stati

identificati due tipi di

spermatogoni

morfologicamente

distinguibili: gli

spermatogoni di tipo A,

che hanno un nucleo

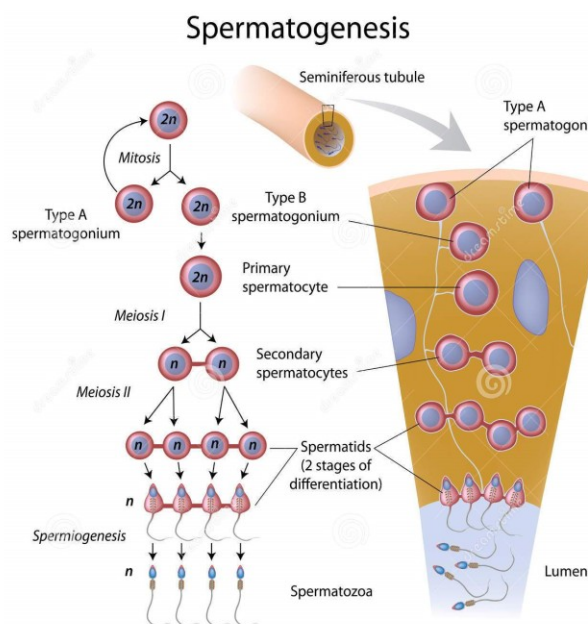


Figura 5

ovale eucromatico, e gli spermatogoni di tipo B, che hanno un nucleo rotondo eterocromatico.

Gli spermatogoni di tipo A, sono ulteriormente distinti in spermatogoni Ad (spermatogoni A dark con colorazioni della cromatina omogenea ed intensa ad eccezione di una piccola area rotondeggiante più chiara) e Ap (spermatogoni A pale con cromatina finemente dispersa e colorazione uniforme e pallida).

Anche se entrambi i tipi sono considerati cellule staminali spermatogoniali, si ritiene che solo gli spermatogoni Ad presentino tipiche caratteristiche di vere cellule staminali del testicolo. Gli spermatogoni Ap presentano tipiche caratteristiche di cellule staminali progenitrici (le cellule progenitrici, in ogni caso dotate d'auto rinnovamento, sono una popolazione di cellule intermedia tra le cellule staminali e le cellule differenziate).

Gli spermatogoni Ad mostrano un basso indice mitotico; al contrario gli spermatogoni Ap proliferano attivamente in periodi definiti nel corso di ogni ciclo dell'epitelio seminifero, producendo sia spermatogoni Ap, sia spermatogoni B. A loro volta gli spermatogoni di tipo B sono capaci di differenziarsi, dare vita agli spermatociti primari ed entrare nel processo della meiosi. A causa di una citochinesi incompleta, gli spermatogoni di tipo B sono interconnessi da ponti intercellulari che formano dei cloni cellulari i quali consentono la sincronizzazione della maturazione delle cellule germinali. Questi ponti intercellulari persistono fino alle ultime fasi della spermiogenesi.

Le cellule germinali, infatti, acquisiscono la loro individualità solo alla spermiiazione, quando allo stadio finale di spermatozoi si distaccano dall'epitelio seminifero rimanendo liberi nel lume del tubulo.

La continuità citoplasmatica tra cellule dello stesso clone consente una distribuzione equilibrata di differenti prodotti genici, che a seguito del processo meiotico sarebbero altrimenti asimmetricamente distribuiti nelle cellule figlie.

1.3 Spermatocitogenesi (la fase meiotica della spermatogenesi)

La fase meiotica ha inizio con la sintesi del DNA negli spermatogoni di tipo B quando perdono contatto con la falda basale (preleptotene). Ultimata la sintesi del DNA, ogni cromosoma è composto da due cromatidi (c).

Queste cellule, caratterizzate dal contenuto di DNA tetraploide ($2n4c$) e definite spermatociti primari, subiscono la prima divisione meiotica.

Durante la prima profase della meiosi avviene la ricombinazione dei geni fra coppie di cromosomi omologhi che permette agli spermatociti di acquisire diversità genetiche e iniziare la sintesi delle proteine. La profase I è il processo più lungo e complicato del processo meiotico (ha una durata di circa 1-3 settimane) ed è suddiviso in 5 stadi: leptotene, zigotene, pachitene, e diplotene.

Il *leptotene* è caratterizzato dalla spiralizzazione della cromatina che si raccoglie in cromosomi filamentosi; questi ultimi sono disposti con i telomeri rivolti verso un polo della cellula e aderiscono all'involucro nucleare. Tali cromosomi sono costituiti da due cromatidi strettamente ravvicinati.

Nel corso dello *zigotene* avviene la sinapsi dei cromosomi omologhi, processo mediante il quale si realizza il loro appaiamento dovuto ad un complesso proteico, chiamato complesso sinaptonemale, che funge da cerniera e tiene stretti i cromosomi. Due cromosomi omologhi appaiati formano la cosiddetta tetrad. In seguito alla sinapsi, nello stadio di *pachitene*, avviene il crossing-over, che comporta lo scambio d'alleli a livello dello stesso locus.

In ogni tetrad avviene almeno un crossing-over e lo scambio di materiale genetico avviene solo tra i cromatidi non fratelli appaiati in seguito alla sinapsi. I punti in cui avviene il crossing-over sono chiamati chiasmi. I chiasmi tengono legati i cromosomi omologhi dopo che il complesso sinaptonemale si è dissolto durante il diplotene. Gli effetti genetici del crossing-over sono importanti perché i cromosomi paterni e materni che formano il bivalente possono presentare differenze in geni corrispondenti. Lo scambio così

avvenuto conduce ad un riassorbimento delle combinazioni fra i geni disposti lungo l'asse di un cromatidio; quindi, dopo il crossing-over, almeno uno dei due cromatidi di ciascun omologo risulta geneticamente differente rispetto alla situazione iniziale. Nel *diplotene* gli omologhi di ciascun bivalente iniziano a separarsi restando però in contatto nei punti in cui si è verificato un crossing-over. L'ultima tappa della profase meiotica è detta *diacinesi* e corrisponde al momento in cui i cromosomi si accorciano e i quattro cromatidi separati diventano evidenti. A seguito di ciò, la membrana nucleare scompare e i cromosomi si dispongono sulla piastra di metafase. Dopo la formazione del fuso, i cromosomi si spostano verso i poli opposti ma, contrariamente alla divisione mitotica, i cromatidi rimangono connessi. La profase I può durare per diversi giorni e occupa il 90% del tempo richiesto per quasi tutta la divisione meiotica. Alla profase I fanno seguito tutte le successive fasi della prima divisione meiotica, metafase, anafase e telofase, che portano alla produzione di due spermatociti secondari (caratterizzati da un numero aploide di cromosomi), mentre la seconda divisione meiotica dà origine a quattro spermatidi. La durata media della meiosi nell'uomo dura 24 giorni.

1.4 Spermiogenesi (la differenziazione degli spermatidi in spermatozoi maturi)

Spermatogoni, spermatociti e spermatidi sono cellule di forma rotonda, ma al termine della meiosi avviene un completo rimodellamento cellulare che dà agli spermatidi una forma molto affusolata, e li trasforma in spermatozoi. Questo processo, che avviene senza altre divisioni cellulari, prende il nome di spermiogenesi e dura circa 30 giorni (De Kretser, 1969);

La spermiogenesi determina il cambiamento dell'organizzazione di tutte le parti della cellula, sia nel nucleo che nel citoplasma.

La complessa sequenza d'eventi di trasformazione, che porta ad ottenere spermatozoi con motilità e capacità di fecondare un ovocita, comprende:

- ✓ la fase del Golgi;
- ✓ la fase del cappuccio;
- ✓ la fase acrosomiale;
- ✓ la fase di maturazione;

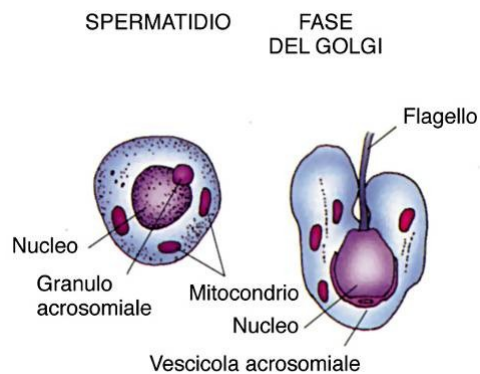


Figura 6

Durante la fase del Golgi inizia la formazione dell'acrosoma; una serie di granuli, noti come granuli proacrosomici, che originano dal complesso di Golgi, confluiscono formando la vescicola acrosomica (Figura 6).

Nella fase del cappuccio la vescicola acrosomica diventa più grande e va a rivestire circa i 2/3

anteriori della superficie nucleare (cappuccio acrosomico). I due centrioli, prossimale e distale, si dispongono al polo del nucleo opposto al granulo acrosomico.

La fase acrosomiale si caratterizza per le considerevoli modificazioni dell'acrosoma, del nucleo e del flagello. Il nucleo si dispone in stretta apposizione con la membrana cellulare nella regione rivestita dal cappuccio acrosomico, la formazione del flagello prende avvio da uno dei due centrioli e i mitocondri migrano verso il flagello disponendosi intorno al suo tratto prossimale (Figura 7). In questa

FASE ACROSOMIALE

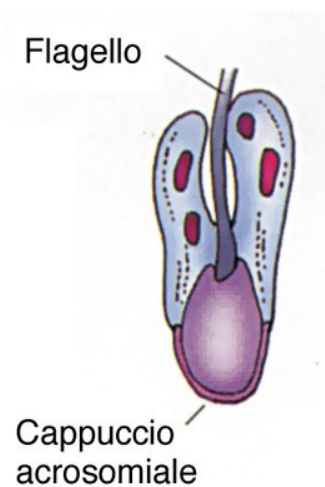


Figura 7

FASE INIZIALE DI MATURAZIONE

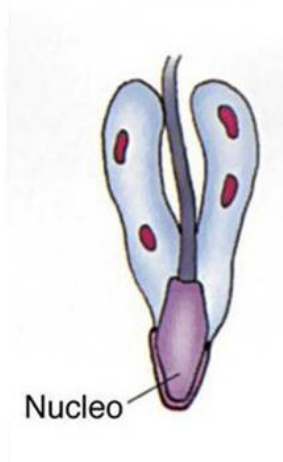


Figura 8

fase, un fascio di microtubuli, denominato manchette, si estende dal cappuccio acrosomico verso il flagello in formazione.

Nell'ultima fase, quella di maturazione (Figura 8/9), lo spermatozoo completa il differenziamento in spermatozoo. Il nucleo e l'acrosoma assumono la peculiare struttura specie-specifica che nell'uomo si presenta come ovale.

Nel corso delle ultime fasi della spermiogenesi avviene inoltre una progressiva condensazione della cromatina che diventerà molto compatta; quest'evento corrisponde ad una

stabilizzazione del DNA che favorisce una riduzione del volume nucleare, un sostanziale blocco della trascrizione e resistenza del DNA alla digestione. Queste modificazioni del DNA sono accompagnate dalla sostituzione delle protammine istoniche con proteine molto basiche e ricche d'arginina, le protammine. Alla fine della spermiogenesi, e subito prima della spermiiazione, la maggior parte del citoplasma residuo degli spermatidi, che si è localizzato in posizione caudale alla coda, è eliminato dalle cellule, costituendo i corpi residuali che sono fagocitati dalle cellule del Sertoli (Barbieri M. et al. 1989; Rosati P. et al., 2001). Spermiiazione. La spermiiazione rappresenta la fase conclusiva del processo spermiogenetico. Il citoplasma in eccesso è raccolto in una goccia citoplasmatica, che è eliminata e poi fagocitata dalle cellule del Sertoli. Gli spermatozoi migrano verso l'epididimo in seguito alla pressione generata

FASE MEDIA DI MATURAZIONE

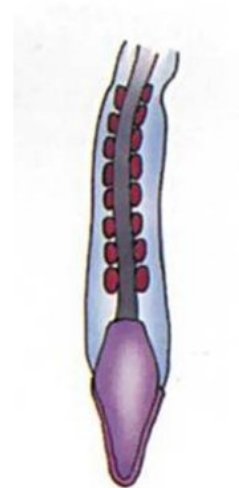
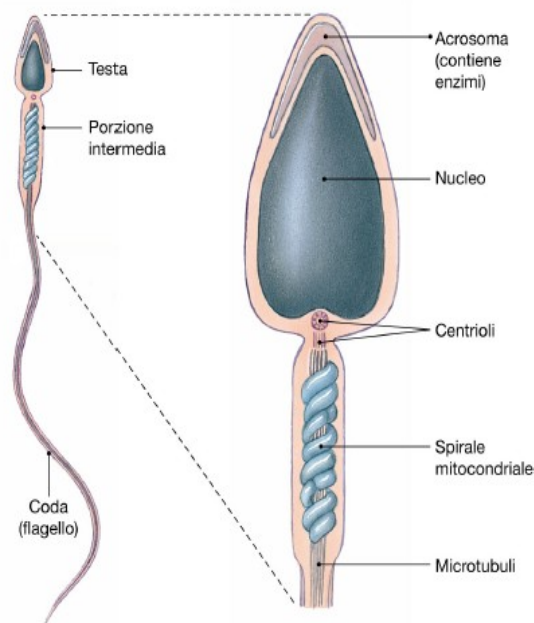


Figura 9

dalla continua formazione di liquido nei tubuli. Nell'epididimo gli spermatozoi maturano ulteriormente: acquisiscono motilità (mediante reazioni che coinvolgono segnali di membrana e che comportano l'attivazione dell'adenilato ciclasi e la mobilitazione di calcio intracitoplasmatico), cambiano metabolismo (acquisiscono la capacità di sfruttare come fonte d'energia fruttosio, sorbitolo e glicerilfosfato), vengono decapacitati, ossia perdono la capacità fecondante, che sarà riacquistata con la permanenza nelle vie genitali femminili.



1.5 Struttura dello spermatozoo

Gli spermatozoi sono cellule lunghe circa 60 μm e sono costituiti dalla testa, il collo e la coda che occupa gran parte della lunghezza cellulare ed è suddivisa in tre porzioni: segmento intermedio, segmento principale e segmento terminale.

Figura 8

La testa è lunga circa 5 μm e comprende il nucleo e l'acrosoma. Il nucleo aploide è condensato ed elettrondenso e anteriormente è rivestito dall'acrosoma che si trova a stretto contatto con la membrana plasmatica. L'acrosoma, che deriva dall'apparato di Golgi, contiene diversi enzimi litici che sono rilasciati durante il processo acrosomiale e che sono necessari allo spermatozoo per penetrare la membrana plasmatica dell'ovocita.

Il collo è lungo circa 1 μm ed unisce la testa alla coda. È formato da 9 colonne di materiale fibroso disposte a cilindro intorno ad un centriolo

collocato in posizione trasversale rispetto all'asse di simmetria dello spermatozoo e chiamato centriolo distale (l'altro centriolo, il centriolo prossimale, scompare dopo aver dato origine al flagello).

La parte posteriore delle 9 colonne dense è in continuità con le 9 fibre esterne che circondano l'assonema nel segmento intermedio della coda. L'assonema è un complesso filamentoso composto da una coppia di microtuboli centrale circondata da nove coppie disposte esternamente (Fig.8). I due microtubuli che formano le 9 coppie esterne sono di diverse dimensioni: il microtubulo più interno (A) è costituito da 13 unità di tubulina mentre quello più esterno (B) è costituito da 11 unità di tubulina. Dal microtubulo più interno si estendono due bracci di dineina che regolano lo scorrimento di una coppia di microtubuli sull'altra. Sempre da questo microtubulo partono raggi che collegano i doppietti di microtubuli esterni alla guaina fibrosa che circonda il doppietto centrale. Un filamento di nexina, invece, collega tra loro le nove coppie di microtubuli esterne.

Il segmento intermedio è caratterizzato dalla presenza della guaina mitocondriale fondamentale per la respirazione e la produzione d'energia. Questa porzione della coda termina a livello dell'anello, una struttura densa sulla quale è fusa la membrana plasmatica impedendo in questo modo ai mitocondri di migrare negli altri segmenti. A livello dell'anello s'interrompono anche 2 delle 9 fibre esterne che circondano l'assonema.

Il segmento centrale è la parte più lunga della coda e misura circa 45 μm . È caratterizzata dalla presenza di 2 colonne di fibre dense (guaina fibrosa) che circondano le 7 fibre esterne e l'assonema.

Il segmento terminale del flagello contiene solo l'assonema circondato dalla membrana plasmatica.

Una volta terminata la spermiogenesi, gli spermatozoi sono rilasciati nel lume del tubulo seminifero, attraversano i canali efferenti, l'epididimo, il canale di Wolff e infine l'uretra al termine della quale abbandonano il corpo.

1.2 Anomalie cromosomiche

Tutte cellule di uno organismo appartenenti a individui della stessa specie hanno lo stesso numero di cromosomi, tranne i gameti che presentano un corredo aploide rispetto alle cellule somatiche (corredo diploide).

Ogni cromosoma ha una dimensione ed un'organizzazione genetica ben definita. Il mantenimento della struttura, del numero e della distribuzione dei cromosomi sono garantiti da processi di riparazione del DNA, da meccanismi di controllo durante il ciclo cellulare (che impediscono a cellule con rotture cromosomiche non riparate di entrare in mitosi) e dalla eliminazione di prodotti anomali (derivati da errori nella meccanica cromosomica, mediante la selezione genetica).

Tuttavia a causa di errori nella ricombinazione o nella segregazione dei cromosomi durante i processi di divisione cellulare, si possono riscontrare dei cambiamenti nel numero e nella struttura dei cromosomi, definiti come anomalie o aberrazioni cromosomiche. A differenza delle mutazioni geniche che avvengono all'interno di un gene, nelle mutazioni cromosomiche sono coinvolti più geni o addirittura interi cromosomi, poiché la regione interessata è più estesa. Si possono quindi verificare rilevanti modificazioni del fenotipo.

Tali mutazioni cromosomiche, proprio perché coinvolgono un tratto esteso del cromosoma o l'intero cromosoma, provocano un'alterazione strutturale che può essere evidenziata mediante analisi citogenetiche.

Le mutazioni cromosomiche possono essere divise in due categorie (Griffiths, 2004):

- 1.** mutazioni o anomalie cromosomiche strutturali;
- 2.** mutazioni o anomalie cromosomiche numeriche.

Questi due tipi di mutazioni hanno origine e conseguenze diverse, poiché nel caso delle anomalie strutturali si può avere perdita, acquisizione o riarrangiamento di materiale genico nei cromosomi, mentre nelle mutazioni

numeriche, non si hanno alterazioni strutturali nelle molecole del DNA di una cellula, ma cambiamenti nel numero dei cromosomi.

Le anomalie cromosomiche possono ulteriormente essere ripartite in due categorie e sulla base della loro distribuzione nelle cellule dell'organismo, distinguiamo tra anomalie costitutive o acquisite.

Le prime si originano durante la gametogenesi o le fasi iniziali di sviluppo embrionale e interessano tutte o la maggior parte delle cellule di un organismo; quelle acquisite hanno origine durante la vita adulta, interessano le cellule derivanti da un singolo clone cellulare e hanno generalmente una distribuzione limitata all'interno di singole parti del corpo (McFadden e Friedman, 1997).

Questo tipo di anomalie è in genere provocato da due meccanismi principali: per rottura di un cromosoma in seguito ad un danno al DNA (per effetto di agenti chimici o fisici, quali radiazioni) e saldatura non corretta delle estremità rotte durante il meccanismo di riparazione; in alternativa per ricombinazione cromosomica. Il cromosoma presenta delle alterazioni nella struttura oppure la perdita o l'acquisizione di materiale genetico.

Questo tipo di mutazioni possono essere distinte in:

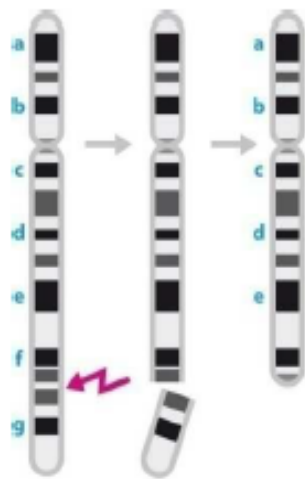


Figura 9 Delezione Terminale

1. delezioni (con perdita di materiale genetico) consistono nella perdita di una parte di cromosoma e vengono classificate come terminali, se avvengono nella parte finale del cromosoma (Fig. 11), e interstiziali, se, in seguito alla rottura di un cromosoma in due punti, avviene la perdita del frammento intermedio e i punti di rottura vengono saldati tra di loro (Fig.12).

Se il frammento cromosomico deleto è privo di centromero, non si aggancerà ai microtubuli e sarà perso nel corso della successiva divisione cellulare. Le delezioni comportano una perdita parziale di materiale genetico, ma sono di solito letali poiché, per assicurare una normale vitalità, la maggior parte dei geni deve essere presente in duplice copia (Griffiths, 2004);

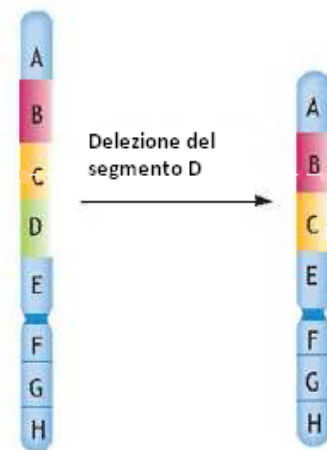


Figura 10 Delezione Interstiziale

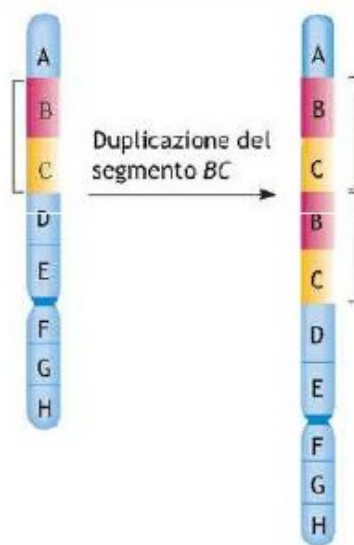


Figura 11

2. duplicazioni (con acquisizione di materiale genetico) quando il segmento staccato viene inserito, anziché sul cromosoma originale, sul suo omologo (Fig. 13).

Le duplicazioni, come le delezioni, possono portare ad errori dello sviluppo, sebbene la presenza soprannumeraria d'alcuni geni sia più tollerata rispetto alla mancanza di una copia di un gene;

3. Inversioni (con cambiamento di orientamento di un segmento di DNA) si genereranno invece quando il segmento libero subisce una rotazione di 180° prima di essere risaldato con il cromosoma originale. Le inversioni, quindi, non comportano perdita di materiale genetico, ma possono determinare la perdita di funzionalità di geni importanti se i punti di rottura da cui hanno origine ricadono

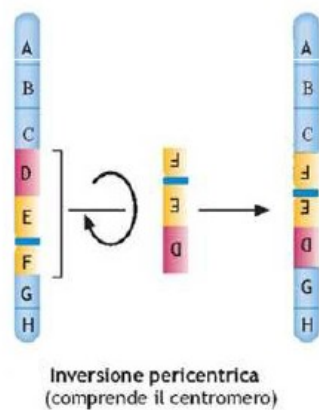


Figura 12

all'interno della struttura di un gene o nelle regioni regolatrici della trascrizione. Le inversioni possono essere di due tipi: pericentriche, se il segmento che subisce la rotazione include il centromero (Fig. 14) e paracentriche, se non lo comprende;

4. traslocazioni (con spostamento di un segmento di DNA) al pari delle inversioni, anche queste non comportano nessuna perdita o

acquisizione di materiale genetico. Possono essere distinte in reciproche e Robertsoniane (dette anche fusioni centriche);

5. trasposizioni con spostamento di materiale genetico.

Ognuna di queste anomalie potrà avere ripercussioni a livello dell'appaiamento dei cromosomi omologhi nella meiosi (specialmente nei casi in cui l'anomalia è eterozigote, vale a dire colpisce solo uno dei due cromosomi omologhi), nella fertilità di un individuo e potenzialmente nell'evoluzione. In taluni casi un individuo con riarrangiamento cromosomico può avere un fenotipo normale ma con un rischio elevato di generare gameti anomali. Nell'uomo la frequenza delle mutazioni cromosomiche strutturali è di 1×10^{-3} .

In molti casi la rottura del cromosoma ed il ricongiungimento delle estremità rotte comportano semplicemente cambiamenti nella disposizione dei geni, senza variazioni della quantità del materiale genetico e di conseguenza senza variazioni fenotipiche.

Queste anomalie sono definite quindi bilanciate e riguardano le inversioni e traslocazioni reciproche. Se invece nella rottura cromosomica si ha perdita o modificazione di materiale genetico, si verifica un'anomalia sbilanciata, come nel caso di delezioni e duplicazioni, in cui cambia il "dosaggio" genico

di un segmento cromosomico (cioè la quantità di quel gene nel genoma), con alterazioni a livello fenotipico.

Se la rottura non è riparata, viene a crearsi un frammento del cromosoma con centromero ed un frammento acentrico, vale a dire privo di centromero, che verrà perduto nella prima divisione cellulare in quanto non può essere impiegato nel fuso mitotico.

Una **traslocazione** è una mutazione cromosomica, in conseguenza della quale vi è un cambiamento nella posizione, e quindi una diversa localizzazione nel genoma, di segmenti cromosomici e delle sequenze geniche in essi contenute.

La traslocazione può essere intracromosomica, se lo spostamento del tratto cromosomico avviene in una regione diversa dello stesso cromosoma, o intercromosomica se lo spostamento avviene da un cromosoma ad un altro non omologo.

Nella traslocazione intracromosomica non reciproca avviene lo spostamento di un segmento di DNA in un'altra zona dello stesso cromosoma; nella traslocazione intercromosomica non reciproca avviene lo spostamento di un segmento di DNA su un cromosoma diverso mentre in quell'intercromosomica reciproca si verifica lo scambio di tratti non omologhi tra due cromosomi.

In una traslocazione non vi è né aumento né perdita di materiale genetico; nella maggior parte dei casi si tratta di riarrangiamenti bilanciati a cui non sono associati cambiamenti fenotipici evidenti. Tuttavia questo tipo d'alterazione strutturale a livello cromosomico può comportare una diminuzione della fertilità a causa della formazione di gameti geneticamente sbilanciati. In particolare i problemi riproduttivi sono dovuti a disturbi durante la sinapsi e la segregazione dei cromosomi nel corso della meiosi (Morel et al, 2004; Pellestor, 1990).

Le **traslocazioni Robertsoniane** originano dalla rottura d'entrambi i cromosomi in prossimità del centromero. Il riarrangiamento riguarda esclusivamente i bracci lunghi dei cromosomi acrocentrici (i bracci corti sono perduti) che si uniscono nella zona centromerica, formando un nuovo cromosoma metacentrico o sub metacentrico.

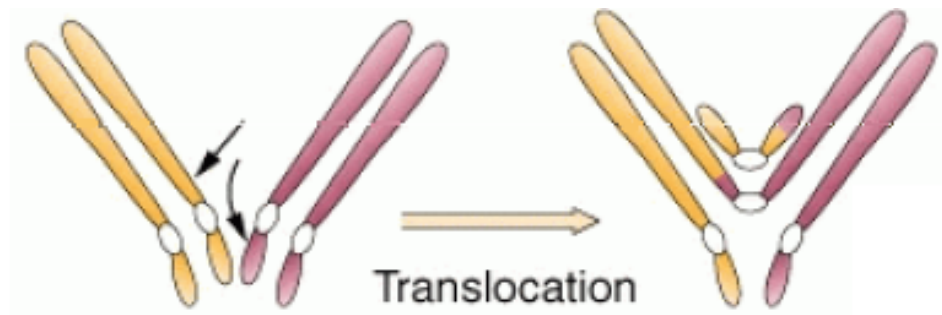


Figura 13

In seguito al verificarsi di una traslocazione Robertsoniana, il numero totale di cromosomi sarà $2n-1$, anche se non vi sarà perdita di materiale genetico; questa perdita, infatti, non comporta nessun effetto fenotipico poiché i bracci corti dei cromosomi acrocentrici contengono solo i geni ripetuti per l'RNA ribosomale (rDNA), presenti anche sugli altri cromosomi acrocentrici.

Le traslocazioni robertsoniane possono coinvolgere tutte le combinazioni possibili di cromosomi acrocentrici, che nella specie umana sono i cromosomi 13, 14, 15, 21 e 22.

Questo tipo di traslocazione è molto frequente nell'uomo (frequenza 1:1000). Gli individui portatori di questa traslocazione hanno un cariotipo di 45 cromosomi e possono produrre gameti che, dopo la fecondazione, genereranno un embrione normale oppure embrioni monosomici o trisomici.

Una considerazione particolare merita la forma di traslocazione Robertsoniana che è responsabile della sindrome di Down familiare (a volte citata come ereditaria e responsabile del 5% circa di tale patologia). La più nota e diffusa sindrome di Down è causata dalla trisomia del cromosoma 21

che si verifica in seguito a fenomeni di non disgiunzione meiotica. La forma familiare della sindrome di Down invece è causata da una traslocazione che vede coinvolti i cromosomi 14 e 21; gli individui affetti, pur presentando un assetto cromosomico di 46 cromosomi, hanno una parziale trisomia del cromosoma 21 in quanto possiedono il cromosoma traslocato che hanno ereditato da uno dei genitori. Di fatto, in seguito alla traslocazione, si forma un singolo cromosoma sub metacentrico, costituito dalla fusione dei bracci lunghi dei cromosomi 14 e 21, mentre dalla fusione dei due bracci corti si origina un cromosoma molto piccolo, privo di centromero che si perde. Un soggetto portatore di questa traslocazione, alla conta dei cromosomi appare monosomico, quindi con 45 cromosomi, mentre con un'accurata analisi citogenetica si rileva la presenza di tutte le coppie cromosomiche e quindi uno stato di quasi diploidia. Infatti, tutte le informazioni genetiche dei cromosomi 21 e 14 sono presenti sia nel "nuovo" cromosoma metacentrico, che deriva dalla fusione centrica, sia negli altri cromosomi 21 e 14, che sono regolarmente presenti. Pertanto un tale soggetto "portatore" della traslocazione è detto "falso monosomico", non ha alcuna sintomatologia ed è fenotipicamente normale; però, avendo un cromosoma 21 traslocato, può generare sia figli affetti dalla sindrome di Down, sia normali.

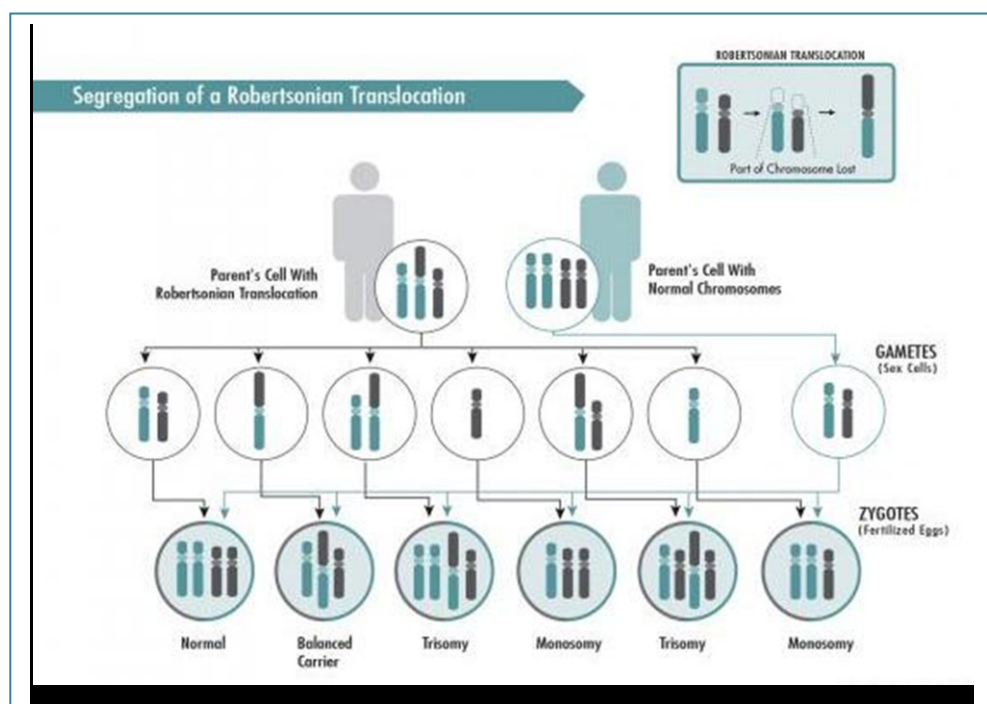


Figura 14

Come per altre traslocazioni, durante la gametogenesi, si possono formare dei gameti sbilanciati secondo il tipo di segregazione. Normalmente durante la profase della meiosi I, i cromosomi omologhi vanno incontro ad un completo appaiamento, detto sinapsi, formando un'unica struttura che prende il nome di bivalente. Nei portatori di traslocazioni Robertsoniane, alla profase I meiotica si viene a formare una esade o trivalente (6 cromatidi o tre cromosomi) composta dal cromosoma derivato dalla fusione centrica e dai 2 cromosomi normali omologhi. La segregazione potrà essere alternata, con la formazione di un gamete normale e uno bilanciato, o adiacente, che porterà alla formazione unicamente di gameti sbilanciati.

Una **traslocazione** reciproca si può verificare a seguito di uno scambio bidirezionale di materiale genetico tra due cromosomi non omologhi dovuto a rotture del DNA, dalle quali originano dei frammenti di cromosoma liberi che, a causa d'errori nel processo di riparazione, sono saldati in maniera errata ad un altro cromosoma danneggiato non omologo, dando origine, in questo modo, a due cromosomi derivati.

Il materiale genetico è riarrangiato, senza cambiamenti nella sua quantità, perciò questo tipo di traslocazione è definita bilanciata.

Come per le inversioni, generalmente non si hanno conseguenze a livello fenotipico a meno che non sia distrutta o perturbata la funzione di un gene importante.

Nei ceppi omozigoti per una traslocazione reciproca (caso in cui l'anomalia colpisce entrambi i cromosomi omologhi), la meiosi avviene normalmente, dato che tutte le paia di cromosomi possono appaiarsi correttamente e il crossing-over non produce nessun cromatidio anormale. Nei ceppi eterozigoti per una traslocazione reciproca (caso in cui l'anomalia colpisce uno solo dei due cromosomi omologhi), invece, le diverse parti dei cromosomi omologhi si appaiano al meglio. Il risultato dell'appaiamento tra un assetto di cromosomi normali e un assetto di cromosomi traslocati è una

configurazione a croce durante la profase della prima divisione meiotica. Queste figure a croce sono costituite da quattro cromosomi associati, ciascuno parzialmente omologo ad altri due cromosomi del gruppo.

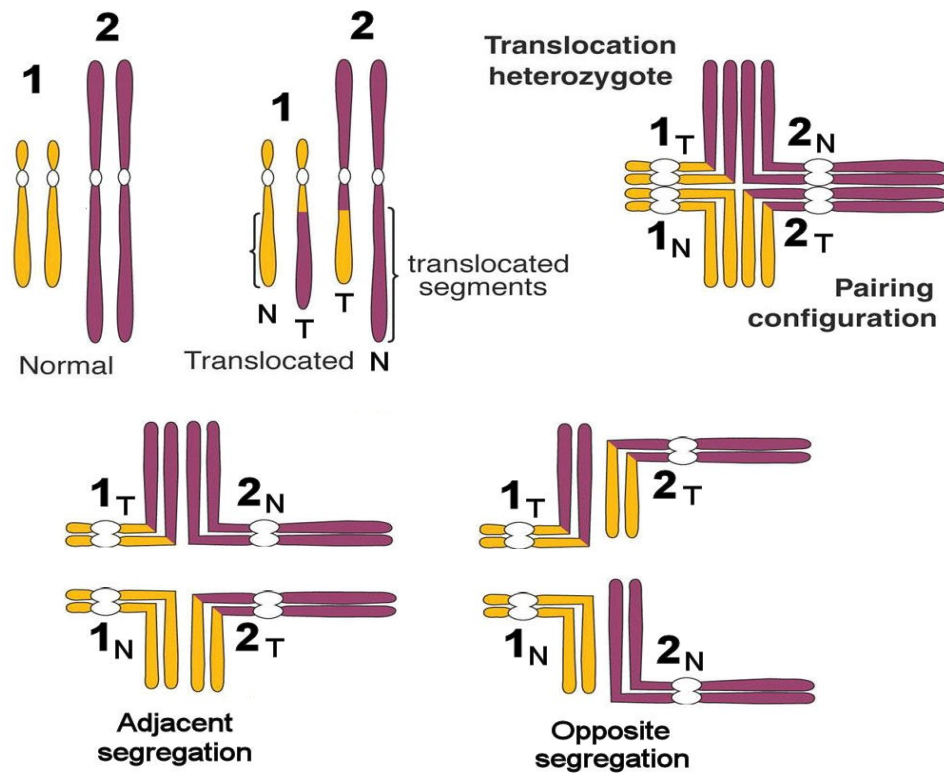


Figura 15

La segregazione all'anafase I avviene in tre modi diversi:

1. segregazione alternata, durante la quale saranno prodotti 2 tipi di gameti: normali e bilanciati. I gameti normali erediteranno i 2 cromosomi non traslocati mentre quelli bilanciati entrambi i cromosomi traslocati; perciò nel caso di segregazione alternata, non si avrà perdita o acquisizione di materiale genetico e gli embrioni derivanti dalla fecondazione con un gamete normale di sesso opposto saranno geneticamente bilanciati, anche se potranno essere portatori della traslocazione;
2. segregazione adiacente I durante la quale centromeri adiacenti non omologhi migrano allo stesso polo; in questo caso la cellula figlia riceve un cromosoma normale ed uno traslocato. I quattro gameti

prodotti sono tutti sbilanciati, con delezioni e duplicazioni e generalmente non vitali. Questo tipo di segregazione avviene circa con la stessa frequenza della segregazione alternata;

3. segregazione adiacente II durante la quale i centromeri adiacenti di cromosomi omologhi migrano allo stesso polo: in questa situazione una cellula figlia riceve entrambe le copie del centromero dello stesso cromosoma omologo (normale o traslocato) ed i gameti risultanti pertanto, sono tutti sbilanciati, con delezioni e duplicazioni in regioni cromosomiche, e mai vitali. Questo tipo di segregazione si verifica molto raramente.

Pertanto dei sei gameti teoricamente possibili, i due derivati dalla segregazione alternata sono funzionali, i due derivati dalla segregazione adiacente I sono generalmente non vitali (a causa di duplicazione e deficienze di geni), e i due della segregazione adiacente II vengono prodotti raramente e comunque sono non vitali. Inoltre, poiché la segregazione alternata e la segregazione adiacente I avvengono circa con la stessa frequenza, a questa situazione è applicato il termine di *semisterilità*.

1.2.1 Meccanismi di formazione delle anomalie cromosomiche strutturali

Lo scambio di materiale genetico tra cromatidi fratelli e cromosomi omologhi è un prerequisito per il normale svolgersi del processo meiotico. Se questo scambio avviene tra regioni cromosomiche non omologhe si potranno formare dei riarrangiamenti strutturali.

Come visto in precedenza, questo scambio non omologo può avvenire tra cromatidi fratelli (intracromosomiale), tra cromosomi omologhi (intercromosomiale) o tra due cromosomi differenti. Sono state formulate diverse ipotesi per spiegare la genesi dei riarrangiamenti strutturali, come ad esempio l'ipotesi rottura-riunione (Wolff, 1961; Evans, 1962) e l'ipotesi dello scambio (Revell, 1963). L'utilizzo di tecniche di citogenetica molecolare ha

consentito di chiarire diversi aspetti del meccanismo di formazione delle anomalie strutturali dovute a rotture cromosomiche, per la formazione delle quali sono necessari almeno tre passaggi:

1. una rottura cromosomiale dà inizio al processo; questa può originare spontaneamente o a causa dell'azione di sostanze mutagene;
2. se la sequenza nella quale ha avuto origine la rottura contiene delle sequenze ripetute all'interno del genoma, queste potranno interagire con sequenze presenti su cromosomi diversi o in un'altra regione dello stesso cromosoma;
3. l'appaiamento tra sequenze omologhe appartenenti a locus diversi potrà risultare nella formazione di un riarrangiamento strutturale, la cui natura dipenderà dal modo in cui la rottura viene riunita, dalla localizzazione, grandezza e orientamento delle regioni omologhe di appaiamento e dal numero di eventi di crossing-over che avverranno.

L'appaiamento tra sequenze omologhe presenti in alleli diversi può essere quindi alla base della formazione d'anomalie strutturali durante la fase di crossing over (NAHR -ricombinazione omologa non allelica). Duplicazioni e delezioni potranno verificarsi a seguito d'eventi di NAHR tra cromosomi omologhi o cromatidi fratelli. Se l'evento di NAHR avviene tra sequenze presenti sullo stesso cromatidio si formeranno delezioni o inversioni. Le traslocazioni invece possono originarsi da eventi di NAHR tra differenti cromosomi (Gersen and Keagle, 2005).

1.2.2 Anomalie cromosomiche numeriche

Le anomalie cromosomiche numeriche possono essere di 2 tipi: variazioni nel numero d'interi assetti cromosomici (euploidia aberrante) e variazioni nel numero di uno o pochi cromosomi (aneuploidia).

Questo tipo d'anomalie non comporta un'alterazione della struttura dei cromosomi, ma un cambiamento dell'assetto del corredo cromosomico dovuto alla perdita o acquisizione di uno o più cromosomi.

Il termine euploidia aberrante indica una condizione tale che il numero cromosomico è variato rispetto al normale per interi set aploidi.

Gli individui e/o le cellule che presentano soltanto il numero n di cromosomi caratteristico della specie, sono detti monoploidi (normalmente indicati come aploidi).

Differentemente la variazione di numero per interi multipli del set aploide prende il nome di poliploidia, situazione che si origina durante la divisione cellulare, a seguito del fatto che alla cariocinesi non fa seguito la citocinesi; in questo caso gli individui, e/o le cellule mutate, saranno detti poliploidi e più specificatamente potranno essere indicati come: triploidi ($3n$), tetraploidi ($4n$), pentaploidi ($5n$)...

Endomitosi ed endoreduplicazioni sono i meccanismi alla base della poliploidia; in caso di endomitosi non si realizza un regolare coinvolgimento dell'apparato mitotico, perciò l'involucro nucleare non si dissolve e quindi il processo di separazione dei cromatidi avviene dentro il nucleo.

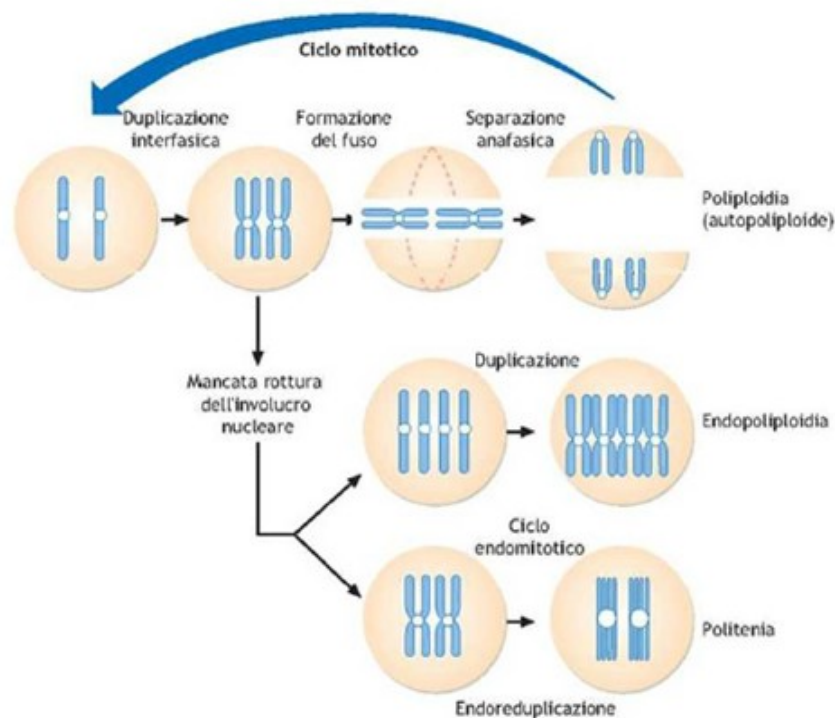


Figura 16

Sempre per mancata formazione del fuso mitotico si origina la condizione d'endoreduplicazione, in cui ad ogni divisione cellulare, i cromosomi duplicati non si separano e appaiono particolarmente ispessiti poiché i cromatidi fratelli non migrano, ma rimangono trattenuti assieme dal centromero. In casi d'aneuploidia, la mutazione provoca una variazione del numero di singoli cromosomi e quindi il numero totale di cromosomi non è multiplo di un assetto completo (n).

Nell'uomo, un individuo aneuploide può avere un cromosoma in soprannumero (trisomia, $2n+1$), due cromosomi in soprannumero (tetrasomia, $2n+2$), uno in meno (monosomia, $n-1$) oppure può perderli completamente (nullisomia, $2n-2$). Casi di trisomia implicano la presenza di un singolo cromosoma in più; la cellula ha tre copie di un particolare cromosoma e due copie degli altri cromosomi. Il meccanismo genetico alla base della trisomia può essere una non-disgiunzione alla meiosi in un genitore che quindi produce un gamete con due copie di un dato cromosoma e una copia di tutti gli altri cromosomi.

Casi di tetrasomia comportano la presenza di un paio cromosomi in più; sono dunque presenti quattro copie di un certo cromosoma e due copie degli altri cromosomi. Alla base della tetrasomia può esservi ad esempio una non-disgiunzione che riguarda lo stesso cromosoma alla meiosi in entrambi i genitori, dando quindi origine in ciascuno ad un gamete con due copie di quel cromosoma e una copia di tutti gli altri cromosomi dell'assetto. La situazione monosomia implica la perdita di un singolo cromosoma. Meccanismo alla base di questo fenomeno può essere una non-disgiunzione alla meiosi di un genitore che produce un gamete privo di copie di un determinato cromosoma e con una copia di tutti gli altri cromosomi. Casi di nullisomia sono invece conseguenti alla perdita di un paio di cromosomi omologhi. Questo fenomeno si spiega ipotizzando una non-disgiunzione per lo stesso cromosoma alla meiosi in entrambi i genitori, con produzione di gameti privi di copie di quel cromosoma e con una copia di tutti gli altri

cromosomi dell'assetto. Le aneuploidie sono la causa di svariate malattie genetiche nell'uomo; infatti, poiché in questo tipo di mutazioni non cambia la struttura genica, ma il numero di copie d'alcuni geni, gli effetti negativi sono una conseguenza di uno squilibrio del dosaggio genico, che spesso influenza il corretto sviluppo dell'individuo (Hook 1985; Epstein 1986; Hecht and Hecht 1987).

1.2.3 Aneuploidie autosomiche

A causa dell'alto dosaggio genico la maggior parte delle trisomie degli autosomi e la totalità delle monosomie sono incompatibili con la vita.

Queste anomalie del numero d'autosomi, infatti, producono una rilevante selezione negativa prenatale perché possono portare sia al mancato impianto dell'embrione, già a livello di blastocisti, sia all'aborto spontaneo, oppure alla formazione d'embrioni con gravi difetti organogenetici, con la presenza di cromosomi soprannumerari, che determinano la morte del feto. Tuttavia alcune trisomie degli autosomi sono compatibili con un completo sviluppo dell'embrione e con la vita, anche se i nati avranno spesso un fenotipo gravemente anomalo.

I casi più noti di trisomia degli autosomi riguardano il cromosoma 21 (individui affetti da sindrome di Down), il cromosoma 18 (individui affetti da sindrome d'Edwards) ed il cromosoma 13 (individui affetti da sindrome di Patau).

Trisomia del cromosoma 21: costituisce la più comune variazione del set cromosomico riscontrabile nella specie umana ed è nota come sindrome di Down. Tale condizione si manifesta con una notevole varietà di cariotipi anche se appare più largamente prevalente nella popolazione il cariotipo 47,XX, +21 o 47,XY,+21 detto trisomia primaria del cromosoma 21 per distinguerlo dalla cosiddetta trisomia secondaria frutto di una traslocazione Robertsoniana.

La frequenza varia in funzione dell'età della madre (dati statistici mostrano un maggiore rischio di generare un figlio Down per le donne in età avanzata) e si ritiene che i motivi di un così rilevante incremento del rischio di trisomia 21 in figli di madri con età avanzata siano correlati alle particolari fasi in cui si svolge la gametogenesi e quindi la meiosi della donna che inizia in epoca prenatale.

Gli individui soggetti a questa sindrome manifestano un quadro clinico caratteristico con "facies" appiattita e larghi occhi con pieghe epicantiche, configurazione anormale delle linee palmari, bassa statura, ritardo mentale. Il 40% dei soggetti con questa sindrome è affetto da disturbi cardiovascolari congeniti, la maggiore causa di morte precoce, e comuni sono i difetti a livelli del tubo digerente e della tiroide. Le aspettative di vita sono minori e anche se molti individui affetti raggiungono la vita adulta, nella maggior parte dei casi non superano i 50-60 anni di età.

Trisomia del cromosoma 18: provoca la cosiddetta sindrome d'Edwards (47,XX,+18; 47,XY,+18); anche in questo caso si rileva una maggiore incidenza con l'aumento dell'età della madre.

La sindrome, caratterizzata da un complesso di malformazioni rilevanti e diffuse nell'organismo, con gravi condizioni di ritardo mentale e motorio, è a prognosi infausta con sopravvivenza intorno ai 3 mesi per i maschi e 9 mesi per le femmine, soprattutto a causa delle marcate condizioni di cardiopatia ed encefalopatia.

Studi citogenetici hanno evidenziato che la non-disgiunzione, che causa la trisomia 18, può essere meiotica o mitotica.

Trisomia del cromosoma 13: provoca il quadro clinico noto come sindrome di Patau (47,XX,+13; 47,XY,+13); anch'essa si manifesta con gravi malformazioni congenite, evidente ritardo psicomotorio, con aspettative di vita di circa 3-4 mesi sebbene alla nascita si assista ad una crescita all'apparenza normale. Si riscontra ancora una volta l'aumento dell'incidenza in rapporto all'età avanzata della madre.

1.2.4 Aneuploidie sessuali

Queste variazioni numeriche, a differenza di quelle autosomiche, sono molto meglio tollerate dall'organismo umano, tanto che i relativi difetti fenotipici sono molto meno deleteri rispetto ad equivalenti variazioni di numero degli autosomi. In genere producono alterazioni del fenotipo sessuale ed infertilità, modificando caratteristiche ormonali e somatiche connesse al regolare accrescimento dei soggetti; di solito non sono letali anche se, per la sopravvivenza, è necessaria la presenza nelle cellule di almeno un cromosoma X (la monosomia 45,Y0 è incompatibile con la vita fin dai primi momenti dell'embriogenesi).

La differenza nella gravità degli effetti fenotipici tra aneuploidie autosomiche e sessuali sembra sia da correlare a due principali motivi: a) il modesto dosaggio genico del cromosoma Y (pochi geni, fondamentale quelli riguardante la mascolinità), b) l'effetto di compensazione di dose genica che si ha tramite l'etrocromatizzazione di uno dei cromosomi X.

Trisomia XXY: nota anche come sindrome di Klinefelter è una tra le più frequenti aneuploidie dei cromosomi sessuali. La facies caratteristica ed il relativo quadro clinico sono evidenziabili in epoca successiva alla pubertà e sono in sostanza riconducibili a difetti dello sviluppo sessuale. I soggetti, di sesso maschile, presentano testicoli spesso vincolati all'addome o addirittura in cavità; sono clinicamente sterili perché il mancato sviluppo dei testicoli non consente la produzione di spermatozoi (azoospermia da difetti strutturali dei tessuti dei tubuli seminiferi).

Gli individui affetti da questa trisomia sono longilinei, di alta statura, con ossa lunghe di rilevanti dimensioni, mostrano evidente ginecomastia (sviluppo mammario anomalo), disposizione del tessuto adiposo, dei peli nel corpo e tono della voce simili a quelli femminili con carenza di ormoni maschili. Ancora una volta l'errore che porta alla trisomia sembra sia da correlare all'età della madre; la maggior parte dei Klinefelter sarebbe generata da uno spermatozoo normale (23,XY) e da un ovocita 24,XX.

Pertanto la maggior parte degli errori di non disgiunzione sarebbe prodotta durante l'ovogenesi.

Trisomia XYY: quest'anomalia del numero dei cromosomi sessuali si manifesta con condizioni somatiche alterate di lieve entità, il più delle volte senza conseguenze cliniche. I soggetti sono di sesso maschile, presentano un secondo cromosoma Y e quindi un cariotipo 47, XYY; in genere sono caratterizzati da un'altezza superiore alla media, senza sintomi fisici apprezzabili.

Monosomia del cromosoma X: si tratta di un'aneuploidia tra le più ricorrenti ed è definita sindrome di Turner causata dalla monosomia 45, XO. Gli individui soggetti a questa sindrome sono fenotipicamente di sesso femminile, presentano gonadi femminili anche se ipoplasiche o più frequentemente, costituite soltanto da strisce di stroma, connettivale; sono quindi sterili, con amenorrea primaria, hanno un utero ipoplastico ma normali genitali esterni femminili.

A livello somatico, il quadro clinico caratteristico è la bassa statura, collo taurino con pterigio (due pieghe cutanee disposte lateralmente tra il cranio e le spalle), rime palpebrali rivolte verso il basso, irregolarità scheletriche, costrizione aortica, capezzoli rivolti lateralmente, tono della voce cupo e mascolino e modesto sviluppo dei caratteri sessuali secondari a causa del non corretto accrescimento delle gonadi a cui consegue la mancanza dei relativi ormoni.

La causa di quest'alterazione risiede nel contributo di spermatozoi privi di cromosoma sessuale; studi hanno evidenziato che l'unico cromosoma X sia d'origine materna, pertanto l'errore di non disgiunzione avverrebbe durante la spermatogenesi, indifferentemente alla I o II divisione meiotica. Altra causa possibile è che la sindrome di Turner sia determinata da anomalie della struttura del cromosoma X, quali la costituzione di un isocromosoma per i bracci lunghi o di un cromosoma X deleto parzialmente nei bracci corti.

1.2.5 Meccanismi di formazione delle anomalie cromosomiche numeriche

Col fenomeno della meiosi sono generati 2 gameti aploidi mediante un processo specializzato di divisione cellulare che consiste in un ciclo di replicazione del DNA seguito da due divisioni cellulari.

La prima divisione, o meiosi I (MI) implica la segregazione dei 2 cromosomi omologhi, mentre durante la meiosi II (MII) la segregazione riguarda i 2 cromatidi fratelli e può quindi essere considerata analoga ad una divisione mitotica. Nel corso della profase I, i cromosomi omologhi si appaiano, formando le sinapsi, e vanno incontro al processo di ricombinazione.

Affinché nel corso della prima divisione avvenga la segregazione dei cromosomi omologhi piuttosto che dei cromatidi fratelli, sono necessari particolari accorgimenti:

- a) il mantenimento delle connessioni fisiche tra i due cromosomi omologhi fino all'anafase I che viene realizzato dai siti di ricombinazione o chiasmi;
- b) la formazione di una qualche costrizione sui centromeri dei cromatidi fratelli, per garantire che questi migreranno verso lo stesso polo, invece che verso poli opposti.

Gli errori della segregazione cromosomica possono avvenire sia nella prima che nella seconda divisione meiotica, anche se risultano essere più frequenti e rilevanti quelli che avvengono durante la prima divisione (Hassold e Hunt, 2001). Questi errori sono comunemente indicati con il termine di non-disgiunzione, ma sono possibili diversi meccanismi di segregazione errata (Bond and Chandley 1983; Bond 1987). Un fallimento nello scioglimento dei chiasmi tra i cromosomi omologhi nel corso dell'anafase I porterà ad una non-disgiunzione 'pura', poiché entrambi gli omologhi migreranno verso lo stesso polo. Uno scioglimento prematuro dei chiasmi o il fallimento nella sua formazione, farà in modo che gli omologhi segreghino in maniera indipendente nel corso dell'anafase I venendo a mancare quelle connessioni fisiche necessarie affinché il processo si svolga senza errori. Qualora

entrambi gli omologhi migrino allo stesso polo, si parlerà di non-disgiunzione “achiasmatica” (Hassold e Hunt, 2001). Oltre che gli omologhi, gli errori della MI possono interessare anche i cromatidi fratelli. Una separazione prematura dei cromatidi fratelli (PSSC-premature separation of sister chromatid) nel corso della prima divisione potrà, eventualmente, comportare la migrazione di un intero cromosoma e di un singolo cromatidio allo stesso polo, mentre verso il polo opposto migrerà solo uno dei due cromatidi separati precocemente. Quindi in seguito a PSSC si potrà generare o non generare un’aneuploidia nelle cellule figlie secondo il comportamento dei due cromatidi liberi nel corso dell’anafase I. Gli errori della MII, invece, sono tipicamente attribuiti al fallimento della separazione dei due cromatidi fratelli.

Nell’uomo sono stati realizzati numerosi studi per indagare l’origine (materna o paterna) e la fase in cui si generano (MI o MII) le principali trisomie. È stata quindi messa in luce l’esistenza di una notevole variazione tra i diversi cromosomi; gli errori paterni causano circa il 50% dei casi di trisomia XXY e di trisomia 21, ma solo del 5-10% dei casi per le trisomie che interessano gli altri cromosomi.

Allo stesso modo la percentuale di trisomie dovute ad errori in MI o in MII varia a seconda del cromosoma considerato. Le trisomie d’origine materna, ad esempio, sono quasi tutte dovute ad errori in MI, mentre le trisomie dei cromosomi sessuali sono associate, in un terzo dei casi, con errori in MII, che riguardano anche più della metà dei casi di trisomia 18 (Bugge et al., 1998; Hassold et al.,1995).

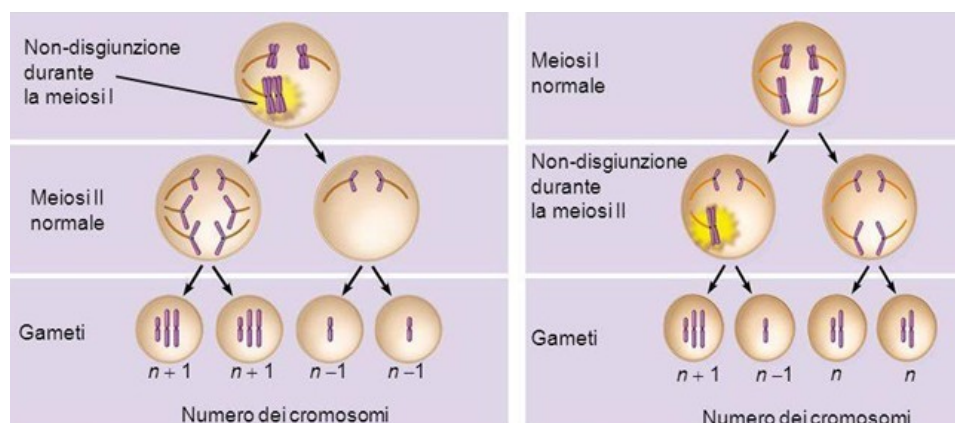


Figura 17

Oltre a queste differenze, gli errori predominanti sono quelli che avvengono nel corso della MI materna. Come detto la ricombinazione tra i cromosomi omologhi gioca un ruolo importante nel corso della meiosi perchè garantisce il mantenimento di una connessione fisica tra gli stessi. Disturbi nel corso del processo di ricombinazione (riduzione o assenza di scambi) sono associati ad eventi di non-disgiunzione. Non solo il numero, ma anche il punto di ricombinazione sembra giocare un ruolo importante nel garantire la corretta segregazione.

In studi meiotici utilizzando cromosomi artificiali di lievito (YAC) è stato visto che cromosomi con un solo scambio terminale (Ross et al., 1996) o pericentromerico (Sears et al., 1995) sono più propensi ad andare incontro ad eventi di non-disgiunzione.

Allo stesso modo, nell'uomo è stata riportata un'assenza o riduzione di ricombinazione nella genesi di diverse trisomie; ad esempio circa il 40% dei casi di trisomia 21 d'origine materna sono causati dall'assenza di formazione dei chiasmi (Lamb et al., 1997).

1.2.6 Effetto intercromosomico

La meiosi è un processo finemente regolato; uno stadio molto importante è la profase I, nella quale si realizza il riconoscimento tra coppie di cromosomi omologhi che si fondono (sinapsi) grazie alla presenza di un complesso proteico, chiamato complesso sinaptonemale. In seguito alla sinapsi, nello stadio di *pachitene*, avviene il crossing-over, che comporta lo scambio d'alleli a livello dello stesso locus, in ogni tetrad avviene almeno un crossing-over e lo scambio di materiale genetico avviene solo tra i cromatidi non fratelli appaiati in seguito alla sinapsi.

La presenza di riorganizzazioni o alterazioni a livello cromosomico ostacola sia il riconoscimento tra cromosomi omologhi che la successiva distribuzione derivata dal crossing-over (Joyce e McKim 2010; 2011).

Tale situazione può compromettere la fertilità e determinare due conseguenze fondamentali:

1. una anormale progressione della meiosi; per portare a termine la sinapsi durante la profase I della meiosi, i cromosomi riarrangiati adottano complesse geometrie di appaiamento che possono promuovere la comparsa di regioni in cui il processo di sinapsi non si realizza (Oliver-Bonet et al. 2005);
2. produzione di gameti sbilanciati; la produzione di un certa quantità di spermatozoi con squilibri cromosomici si ripercuote in maniera negativa anche sulla fertilità dei soggetti colpiti da riorganizzazioni cromosomiche strutturali. Tali squilibri derivano principalmente dal verificarsi, nei cromosomi riarrangiati, di alcune modalità di segregazione sbilanciate. È inoltre noto, in letteratura, che questi riarrangiamenti possono perturbare gli eventi di disgiunzione e segregazione anche di altre coppie di cromosomi, concorrendo così a favorire lo svilupparsi di anomalie numeriche nei gameti risultanti. Questo fenomeno d'interferenza cromosomica è anche noto come effetto **intercromosomico (ICE)**.

Già nel 1963 Lejeune aveva proposto, nei suoi lavori scientifici, l'esistenza dell'ICE (Lejeune 1963) dopo aver rilevato un aumento della frequenza di portatori di traslocazioni reciproche tra i padri di bambini con sindrome di Down.

L'insorgenza di tali disturbi è legata alla formazione di eterosinapsi tra le configurazioni meiotiche sviluppate dai cromosomi coinvolti nella riorganizzazione che, come detto in precedenza, normalmente presentano regioni in cui non si sviluppano sinapsi, e altre regioni sensibili del genoma (Guichaoua et al. 1990; Cheng et al. 1999; Oliver-Bonet et al. 2005). Alcune regioni genomiche mostrano una maggiore propensione ad essere coinvolte in queste sinapsi irregolari; tali regioni possono essere o quelle con una maggiore tendenza all'eterosinapsi (che sono rappresentate ad esempio dai bracci corti dei cromosomi acrocentrici e dai cromosomi sessuali) o quelle

che presentano lacune o interruzioni nel complesso sinaptonemale (Codina-Pascual et al. 2006).

Alcuni studi hanno correlato il verificarsi di queste interazioni eterosinaptiche intercromosomiche con fenomeni di arresto meiotico (Gabriel-Robez et al. 1986; Johannisson et al. 1987) e hanno dimostrato come tali eventi sono correlati con un'alterazione dei parametri seminali, caratteristica che di fatto accumuna i soggetti portatori di riorganizzazioni cromosomiche strutturali (De Braekeleer and Dao 1991).

Tuttavia, è stato anche ipotizzato che, il verificarsi di eterosinapsi sia un meccanismo cellulare volto a salvare l'arresto meiotico che sarebbe inevitabilmente causato dalla presenza di regioni prive di sinapsi (Chandley et al. 1986; Saadallah Hultén e 1986; Navarro et al. 1991).

Quello che risulta da queste interazioni si traduce in un aumento significativo delle anomalie cromosomiche numeriche nelle cellule risultanti che quindi concorrono a rappresentare una fonte supplementare di squilibrio cromosomico nei portatori di tali riorganizzazioni strutturali.

Sono stati condotti diversi studi per valutare la presenza di ICE analizzando le frequenze numeriche di anomalie nei gameti mediante ibridazione fluorescente in situ (FISH).

I dati presenti in letteratura hanno mostrato risultati divergenti in merito all'effettiva evidenza di un effetto intercromosomico nei soggetti portatori di traslocazioni.

Alcuni autori hanno osservato un aumento significativo di anomalie numeriche per molti dei cromosomi analizzati (Rousseaux et al. 1995a; Rousseaux et al. 1995b; Blanco et al. 1998; Mercier et al. 1998; Blanco et al. 2000; Morel et al. 2001; Baccetti et al. 2002; Anton et al. 2004a; Anton et al. 2004b; Morel et al. 2004; Baccetti et al. 2005; Anton et al. 2006; Chen et al. 2007; Juchniuk de Vozzi et al. 2009; Anton et al. 2010; Pellestor et al. 2011; Vozdova et al. 2011b), altri invece non sono in accordo con i precedenti (Martini et al. 1998; Honda et al. 1999; Estop et al. 2000; Rives et al. 2003;

Mikhaail-Philips et al. 2004; Oliver-Bonet et al. 2004; Mikhaail-Philips et al. 2005; Hatakeyama et al. 2006; Kekesi et al. 2007; Vialard et al. 2007).

La maggior parte degli studi condotti riguarda i cromosomi sessuali, a causa delle loro singolari caratteristiche che li rendono particolarmente inclini a essere coinvolti nei processi di eterosinapsi, e i cromosomi 13, 18, 21.

1.2.7 La tecnica FISH

Negli ultimi anni la messa a punto e i progressi delle tecniche di citogenetica molecolare hanno contribuito in maniera considerevole ad aumentare le capacità risolutive e le applicazioni della citogenetica.

Nella diagnostica citogenetica, sia delle patologie costituzionali che acquisite, l'uso della tecnica di ibridazione fluorescente in situ (FISH) è oggi indispensabile per la corretta caratterizzazione dei riarrangiamenti cromosomici.

L'ibridazione in situ fluorescente è un tipo particolare di ibridazione che impiega sonde la cui presenza può essere segnalata mediante marcatura con molecole fluorescenti. Il principio sfruttato da questa metodologia si basa sulla capacità del DNA a singolo filamento di riconoscere e ibridarsi con sequenze complementari alla propria.

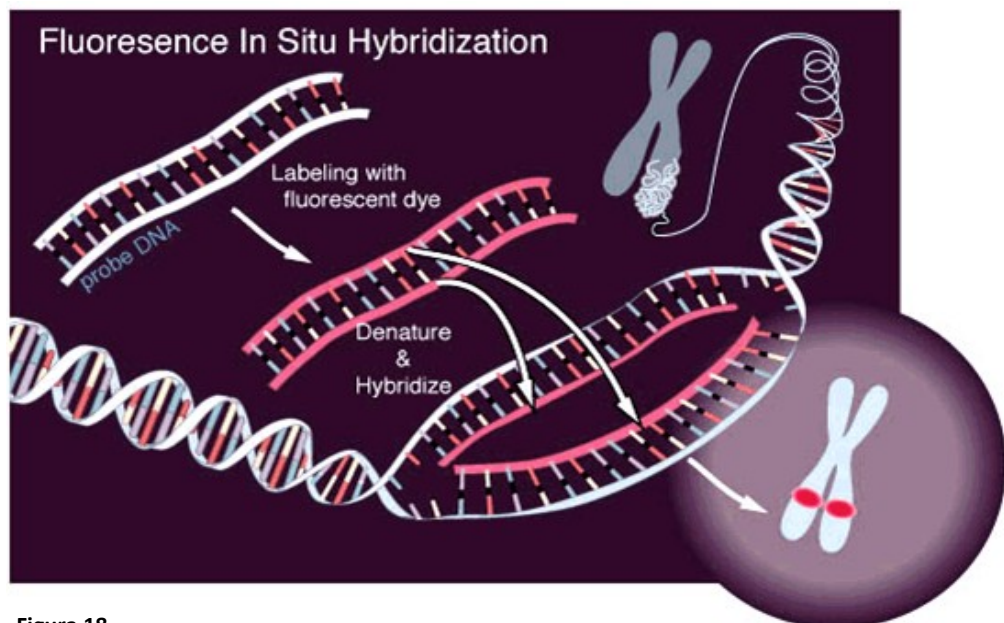


Figura 18

Il DNA di una sonda molecolare nota, subisce dunque un processo di “marcatura”, la quale si avvale di un sistema enzimatico che funziona come un “taglia e cuci”: il DNA della sonda nota viene infatti simultaneamente “tagliato” dall’enzima DNAsi, e “ricucito” dall’enzima DNA polimerasi, in presenza, tra il pool dei nucleotidi trifosfato, di un nucleotide direttamente fluorescente o di uno specifico nucleotide contenente una molecola reporter. Il DNA della sonda nota così marcato viene unito al DNA cromosomico oggetto di studio; si procede alla denaturazione (apertura delle eliche di DNA che viene reso a singolo filamento) e quindi all’ibridazione. Se la sonda nota trova il suo complementare sul cromosoma testato, l’ibridazione ha luogo e ne verrà rilevato il segnale al microscopio a fluorescenza.

Questa tecnica può essere applicata sia ai cromosomi metafasici che ai nuclei in interfase. Per la marcatura della sonda possono essere utilizzate due diverse procedure:

1. Una marcatura indiretta, che prevede l’utilizzo di sonde di DNA contenenti apteni come la digossigenina (DIG) o Biotina. Dopo l’ibridazione delle sonde ad una sequenza di DNA specifica, l’aptene è individuato utilizzando proteine coniugate a fluorocromi, come anticorpi coniugati a fluorocromi (per DIG) o l’avidina (per sonde biotinilate). I principali vantaggi della FISH indiretta sono l’alta sensibilità, l’abilità ad intensificare il segnale e la disponibilità sul mercato di una vasta gamma di reagenti per l’individuazione di quest’ultimo. Di contro, i principali svantaggi da segnalare sono i costi elevati degli anticorpi, i tempi lunghi di colorazione e una non specificità del segnale.
2. Una marcatura diretta che invece prevede l’utilizzo di un fluorocromo incorporato direttamente nella sonda di DNA. In questo modo, il legame sonda – sequenza di DNA specifica può essere individuato mediante microscopia a fluorescenza senza ulteriori passaggi addizionali. Nella ricerca condotta in questo studio sono state utilizzate sonde marcate con

fluoresceina isotiocianato (FITC), tetrametilrodamina isotiocianato (TRITC), aminoetilcoumarin acido acetico (AMTA), Texas Red (TR) e canine dyes (Cy3, Cy5) (Trask, 1991; Yurov et al., 1996).

Vysis fornisce le sonde che sono direttamente marcate con varianti di questi fluorocromi chiamati Spectrum Orange®, Spectrum Green®, Spectrum Aqua®.

Tra i vantaggi che si annoverano per la FISH diretta sono da segnalare: riduzione dei tempi d'individuazione del segnale dopo l'ibridazione e riduzione del segnale non specifico. Di contro, l'unico svantaggio è una riduzione della sensibilità (Reid et al., 1992a) ma questo non determina delle serie limitazioni. Nella FISH possono essere utilizzati 3 tipi di sonde di DNA differenti:

- ✓ sonde centromeriche: riconoscono sequenze di DNA altamente ripetute nella regione centromerica; sono state sviluppate per la maggior parte dei cromosomi umani (Willard and Waye, 1987). Esse generano un segnale intenso a livello del centromero e sono molto utilizzate per lo studio delle aneuploidie. Le sonde centromeriche non sono molto utili per individuare le anomalie strutturali le quali, con l'eccezione delle traslocazioni Robertsoniane, avvengono sui bracci p e q dei cromosomi;
- ✓ sonde con sequenze locus-specifiche: individuano geni a singola copia sui cromosomi (Pinkel et al., 1988; Reid et al., 1992a). Queste sequenze possono essere uniche per un cromosoma e come tali si utilizzano per individuare le aneuploidie in alcuni cromosomi (13, 14, 21, 22) per i quali non esistono sonde centromeriche specifiche.
- ✓ sonde specifiche per le regioni telomeriche: disponibili per tutti i cromosomi, sono di grande utilità per analizzare le anomalie strutturali nei cromosomi, comprese quelle degli spermatozoi umani (Van Hummelen et al., 1996);

- ✓ sonde Whole Chromosome Painting (WCP) sono librerie di DNA cromosoma-specifiche le quali marcano interamente i cromosomi e possono essere usati per individuare i riarrangiamenti strutturali dei cromosomi metafasici (Pinkel et al., 1988; Dauwerse et al., 1992; Kearns and Pearson, 1994). Non sono pertanto utilizzabili nello studio degli spermatozoi i cui cromosomi sono interfasici. Quindi, in sintesi, per la diagnosi di aneuploidie nei nuclei interfasici si ricorre alle sonde centromeriche e alle locus-specifiche. A queste si aggiungono le sonde telomeriche, sviluppate più di recente e specifiche per bracci p e q, che sono particolarmente utili per rilevare anomalie strutturali.

Capitolo II

Infertilità

2. Infertilità e sterilità

Una coppia che dopo un anno di rapporti regolari e non protetti non riesce a concepire è in genere considerata **infertile**. Non bisogna dimenticare, però, che una non trascurabile percentuale di coppie riesce ad avere un figlio dopo due anni di tentativi, per cui molti preferiscono parlare di infertilità dopo 24 mesi (secondo i criteri della Organizzazione Mondiale della Sanità). Invece, se una coppia ha già avuto figli ma non riesce ad averne altri, si dice affetta da **infertilità secondaria**. Complessivamente, l'infertilità riguarda circa il 15% delle coppie. Le cause dell'infertilità sono numerose e di diversa natura. Per alcune di esse, le più diffuse, si può intervenire con diagnosi tempestive, cure farmacologiche e terapie adeguate, ma anche e, soprattutto, con la prevenzione e l'informazione, per altre, è necessario ricorrere alla procreazione medicalmente assistita. La **sterilità** in senso proprio riguarda, invece, le coppie affette da una precisa patologia irreversibile o che restano non fertili anche dopo un iter diagnostico e terapeutico esauriente e svolto in un tempo ragionevole. Quando la sterilità è una condizione permanente non resta che rivolgersi alle tecniche di procreazione medicalmente assistita più sofisticate.

2.1 Stime dell'infertilità

Le stime del tasso di infertilità di una popolazione possono essere di tipo diretto o indiretto. Una stima indiretta prende in considerazione il numero complessivo di coppie in età feconda che non hanno avuto figli. L'assenza di figli, però, perlomeno in una certa percentuale di casi, è una scelta e non un effetto dell'infertilità per cui si corre il rischio di sovrastimare i dati. Le stime dirette dell'infertilità sono certamente più affidabili in quanto si basano su indagini demografiche specifiche condotte sull'intera popolazione o, più spesso, su gruppi campione. Considerando che i vari studi di popolazione danno un indice di fecondità (possibilità di concepire per ciclo) intorno al 25% in coppie giovani, i calcoli

prevedono che nelle nuove coppie il 19% avrà problemi riproduttivi dopo 2 anni e che di queste il 4% sarà sterile e le altre coppie saranno subfeconde. Subfecondità sta ad indicare un indice di fecondità 3 o 4 volte più basso della norma: questo significa che alcune coppie dovranno attendere un tempo maggiore per concepire. Un fattore incisivo di subfecondità è l'età della donna. Sia studi demografici sulla percentuale di nuove coppie sterili che segnalano un aumento progressivo della sterilità con l'età, sia i risultati delle tecniche di Procreazione medicalmente assistita (PMA) dimostrano che esiste una riduzione della capacità di concepire.

2.2 Quali sono le cause dell'infertilità

Valutare quale sia l'impatto dei diversi fattori di infertilità è molto difficile. Una stima affidabile, benché relativa solo ad una parte della popolazione, proviene dai dati riguardanti le coppie che si rivolgono ai centri per la procreazione assistita. I dati raccolti dal Registro Nazionale sulla Procreazione Medicalmente Assistita sono i seguenti:

- infertilità maschile: 35,4%
- infertilità femminile: 35,5%
- infertilità maschile e femminile: 15%
- infertilità idiopatica: 13,2%
- altro: 1%

Inoltre, la letteratura medica sottolinea sempre di più il ruolo di fattori psico-sociali di infertilità dovuti a fenomeni complessi come lo stile di vita, la ricerca del primo figlio in età tardiva, l'uso di droghe, l'abuso di alcool, il fumo, le condizioni lavorative, l'inquinamento.

2.3 Infertilità maschile

Anche la fertilità maschile ha subito una significativa riduzione. Secondo molti studi, la percentuale di milioni di spermatozoi per millilitro si sarebbe quasi dimezzata negli ultimi 50 anni. Per questo motivo circa il 35% dei casi

di infertilità ha una causa maschile. L'infertilità maschile riconosce sicuramente una grossa componente sociale. Su di essa, infatti, oltre alle condizioni soggettive, chiaramente patologiche, sembrano influire anche le condizioni ambientali e lo stile di vita (incluso lo stress). Giungere a conclusioni certe è però più difficile di quanto sembri. I fattori da valutare sono molti ed eterogenei ed esiste una grande variabilità nella conta degli spermatozoi (non solo da individuo ad individuo ma anche da eiaculato ad eiaculato), nella loro morfologia e nella loro capacità di movimento (motilità). Tra l'altro, la stessa conta spermatica non è un indice dimostrato di fertilità, in quanto non esiste una correlazione certa tra numero di spermatozoi e fertilità, tranne nei casi di grave oligozoospermia (riduzione del numero di spermatozoi nel liquido seminale) o azoospermia (assenza di spermatozoi nel liquido seminale). Abbiamo, invece, maggiori evidenze riguardo a specifici fattori di rischio. Alcune condizioni lavorative che espongono a radiazioni, a sostanze tossiche o a microtraumi, aumentano il rischio di infertilità. Anche l'esposizione agli inquinanti prodotti dal traffico urbano agisce negativamente. Il fumo di sigaretta nuoce agli spermatozoi: i fumatori spesso hanno più spermatozoi con morfologia anormale. Lo stesso stile di vita, se eccessivamente stressante, riduce la fertilità. Cause che hanno una rilevanza strettamente medica, sono invece tutte le patologie in grado di alterare la struttura e la funzione del testicolo o del pene (come, ad esempio, criptorchidismo, ipospadia, varicocele, patologie purtroppo in aumento). Il tumore al testicolo, in particolare, è sia un fattore di rischio in se stesso che in conseguenza del trattamento chemioterapico o radioterapico utilizzato (solo il 40% recupera la funzione riproduttiva). Per ovviare alle difficoltà riproduttive cui vanno incontro gli uomini che devono sottoporsi ad una cura per il tumore al testicolo, è possibile raccogliere e crioconservare gli spermatozoi prima di interventi o terapie a rischio. Infine, un fattore noto, sebbene non sempre determinante d'infertilità maschile, è il varicocele (ingrossamento della vena del testicolo). Sono presenti anche

fattori genetici. Ad esempio, si è ipotizzato che un'alterazione sul braccio lungo del cromosoma Y porti ad un aumentato rischio di oligozoospermia (www.iss.it).

L'esame del liquido seminale è l'indagine di laboratorio principale cui deve essere sottoposto un uomo che si trova in condizione d'infertilità.

L'infertilità maschile, infatti, è spesso associata ad una condizione di dispermia ovvero alterazione di uno o più parametri seminali, in particolare, una riduzione della concentrazione, della motilità nemaspermica e della percentuale di spermatozoi con normale morfologia:

| | |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------|
| Normozoospermia | normale concentrazione nemaspermica |
| Oligozoospermia | ridotta concentrazione nemaspermica |
| Criptozoospermia | presenza di spermatozoi nel sedimento |
| Normocinesi | normale motilità nemaspermica |
| Astenozoospermia | ridotta motilità nemaspermica |
| Discinesi | alterazione qualitativa della motilità |
| Acinesi | assenza di motilità |
| Teratozoospermia | alterata morfologia |
| Azoospermia | assenza di spermatozoi |
| Oligoastenoteratozoospermia | ridotta concentrazione motilità e alterata morfologia |

Molteplici possono essere le cause d'infertilità maschile che, però, nel 50% dei casi, rimangono sconosciute (infertilità idiopatica).

Tra le cause note possiamo distinguere cause genetiche e cause non genetiche.

Le cause genetiche d'infertilità maschile possono essere legate sia ad anomalie numeriche e strutturali dei cromosomi (Chandley AC., 1998; Gianaroli et al., 2005), sia a mutazioni a carico di uno o più geni del DNA cellulare o del DNA mitocondriale.

L'introduzione dell'iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI) fra le tecniche di riproduzione assistita (Palermo et al., 1992) ha permesso il trattamento dell'infertilità maschile con tassi di successo sovrapponibili a quelli dell'inseminazione convenzionale.

Alla luce del fatto che i risultati del cariotipo dei nati dopo ICSI riportano un aumento dell'incidenza delle anomalie cromosomiche originate de novo, in particolare dei cromosomi sessuali (Bonduelle et al. 2002), è stato ipotizzato che il contributo paterno alle aneuploidie possa essere rilevante nei casi di fattore maschile grave di infertilità (Gianaroli et al., 2005a-2005b).

Rappresentano cause d'infertilità anche le traslocazioni, reciproche e Robertsoniane (Hook and Hamerton, 1977), così come mutazioni a carico di singoli geni, quali il gene codificante per il recettore degli androgeni e il gene CFTR, che codifica per una proteina di membrana che regola il passaggio d'elettroliti. Anche le mutazioni a carico di geni mitocondriali possono intaccare la capacità fecondante di un individuo. Il genoma mitocondriale, infatti, contiene geni codificanti per diversi elementi essenziali della catena respiratoria che fornisce allo spermatozoo l'energia necessaria al movimento (Diez-Sanchez C. et al., 2003).

Come riportato in precedenza, la spermatogenesi è sottoposta ad uno stretto controllo ormonale da parte dell'asse ipotalamo-ipofisi. È evidente, quindi, che in molti casi le cause d'infertilità maschile sono di natura endocrina. Le gonadotropine FSH e LH prodotte dall'ipofisi anteriore o adenoipofisi, agiscono rispettivamente sulle cellule del Sertoli, favorendo il processo di spermatogenesi, e sulle cellule del Leydig determinando la produzione del testosterone. Nell'ipogonadismo ipogonadotropo si ha una ridotta produzione di questi ormoni che determinano un arresto della spermatogenesi e una riduzione della produzione degli ormoni sessuali.

2.4 Scopo della ricerca

Le traslocazioni cromosomiche si originano da un errato scambio di sequenze geniche tra cromosomi non omologhi durante la fase di crossing-over nella prima divisione meiotica.

Riarrangimenti strutturali sbilanciati nei gameti risultanti comportano, nella maggior parte dei casi, gravi conseguenze cliniche che portano al mancato impianto, all'aborto o riducono drasticamente le probabilità di sopravvivenza del neonato. Al contrario, i riarrangimenti strutturali bilanciati, che non determinano alcuna perdita o guadagno di materiale genico, non portano a gravi conseguenze fenotipiche nei soggetti portatori, eccetto i casi in cui i punti di rottura della traslocazione riguardino un gene funzionale.

Pertanto, la produzione di un elevato numero di gameti con corredo genico sbilanciato da parte di soggetti portatori di traslocazioni bilanciate, è stata correlata ad un aumento delle probabilità di rischio d'aborti spontanei, di prole affetta da anomalie geniche ed infertilità. E' stato stimato che il 2% dei maschi infertili sono portatori di anomalie cromosomiche strutturali (Mau-Holzmann, 2005) e che tali anomalie si riscontrano nel 3,2% delle coppie che hanno effettuato ripetuti cicli di procreazione medicalmente assistita falliti e nel 9,2% nelle coppie con aborti ricorrenti (Stern et al., 1999).

Questi dati confermano quindi l'esistenza di una correlazione fra traslocazioni cromosomiche ed infertilità rilevando i vantaggi dell'utilizzo della diagnosi genetica preimpianto (PGD) per la selezione degli embrioni o gameti con assetto cromosomico normale o bilanciato da quelli geneticamente sbilanciati. E' noto ormai da tempo che gli squilibri genici che portano allo sviluppo delle traslocazioni sono attribuibili ad errori nei processi di meiosi, in cui si verifica un riarrangiamento cromosomico strutturale anomalo che determina una disgiunzione errata delle coppie di cromosomi coinvolti nella traslocazione. Alcuni studi hanno dimostrato che tali squilibri genici, oltre a determinare la formazione di gameti sbilanciati,

sembra possano influire anche sulla corretta segregazione degli altri cromosomi non coinvolti nella traslocazione; tale fenomeno è noto come “effetto intercromosomico” (ICE) (Hecht and Patil, 1977).

Alla luce di quanto esposto, lo scopo di questo studio è quello di valutare il tasso d'aneuploidia negli spermatozoi derivati da 35 pazienti portatori di traslocazioni bilanciate che presentano caratteristiche alterate del proprio liquido seminale secondo i parametri WHO (World Health Organization) del 2010. Nello specifico, sono state analizzate le frequenze di aneuploidia dei cromosomi che risultano più frequentemente alterati in caso di aborti (X, Y, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22).

Capitolo III

Materiali e metodi

3. Analisi del liquido seminale

3.1 Campioni di seme

I liquidi seminali utilizzati nella ricerca sono stati ottenuti mediante masturbazione dopo 2/7 giorni di astinenza sessuale da 35 pazienti portatori di traslocazioni bilanciate (11 traslocazioni robertsoniane e 24 reciproche) in studio presso il centro SISMeR (Società Italiana degli Studi della Medicina della Riproduzione) di Bologna.

3.2 Esame del liquido seminale

I campioni sono stati tenuti a 37°C per circa 20 minuti, tempo necessario perché avvenga il normale processo di fluidificazione, e successivamente sono stati analizzati secondo le linee guida del World Health Organization (WHO 5th edition, 2010).

E' stata quindi eseguita la valutazione macroscopica del campione, necessaria a determinare: viscosità, aspetto, volume, pH, fluidificazione e subito dopo si è proceduto con la valutazione microscopica.

- ✓ La viscosità è una caratteristica reologica di un fluido biologico che dipende dalla sua componente citologica e biochimica; viene considerata normale se il campione fluisce dalla pipetta formando delle gocce che si staccano una dopo l'altra in maniera ritmica e sequenziale, mentre viene considerata aumentata quando scende senza formare delle gocce ma un filamento. Nei casi in cui il liquido seminale è caratterizzato da una scarsa componente nemaspermica e non nemaspermica, la viscosità risulta diminuita.
- ✓ L'aspetto fisiologico del liquido seminale è avorio opalescente. In caso di una riduzione della componente gametica o assenza della componente cellulare non gametica il campione può presentare un aspetto meno opaco definito acquoso; viene definito invece lattescente quando l'eiaculato è costituito esclusivamente dalla

frazione prostatica come avviene in caso di ostruzione delle vie genitali. Un colore rosato, rosso intenso o rosso bruno del seme è, invece, indicativo della presenza di sangue (emospermia).

- ✓ Il volume del liquido seminale è costituito principalmente dalle secrezioni delle vescicole seminali e della prostata e in minor misura dalle ghiandole bulbouretrali e dagli epididimi.
- ✓ Il pH del liquido seminale deriva dalla combinazione del pH alcalino della secrezione vescicolare e del pH acido delle secrezioni prostatiche. La valutazione del pH è stata effettuata facendo diffondere una goccia di campione su cartina tornasole. I valori di riferimento del pH del liquido seminale sono compresi tra 7,2 - 8,2.

Procedendo con la valutazione microscopica è stato eseguito un esame a fresco del campione utilizzando un microscopio ottico e allestendo, con vetrino coprioggetto, un preparato da 10 µl dopo aver miscelato accuratamente il campione seminale onde evitare un'eventuale sedimentazione spermatica.

Dopo aver verificato l'effettiva fluidificazione avvenuta e l'eventuale presenza di zone di agglutinazione (spermatozoi mobili che aderiscono tra di loro testa-testa o coda-coda o in forma mista) si è proceduto con il definire la percentuale di motilità nemaspermatica, la concentrazione e il tipo di morfologia riscontrata nel campione (la verifica della motilità totale è stata effettuata sulla base dei criteri forniti dal WHO 5th edition, distinguendo gli spermatozoi con motilità progressiva, non-progressiva e immobili; per la conta spermatica è stata utilizzata la camera di Neubauer; la morfologia delle cellule spermatiche è stata valutata secondo i criteri di Kruger, (Kruger et al. (1987)) mediante un microscopio ottico con obiettivo ad immersione 100 X e ingrandimento 1000 X (Nikon Labophot-2)). Per ogni campione sono state valutate almeno 100 cellule. Sulla base dei risultati ottenuti in merito alla motilità, concentrazione e morfologia spermatica i pazienti sono stati classificati come segue:

- Oligospermici: se la concentrazione spermatica è $< 15 \times 10^6$ spermatozoi/ml (in accordo con i parametri del WHO).
- Astenospermici, se la percentuale di spermatozoi con motilità progressiva è \leq del 32%, oppure se la percentuale di spermatozoi mobili totali è \leq 40% (in accordo con i parametri del WHO).
- Teratospermici: se la percentuale di spermatozoi morfologicamente normali è \leq 14% (in accordo ai criteri restrittivi di Krüger, 1987).
- Oligoastenoteratospermici: se vengono riscontrati difetti a carico dei tre parametri (conta, motilità, morfologia). Questo gruppo è ulteriormente suddiviso in due sottogruppi: OAT severi (campioni con concentrazione spermatica $\leq 5 \times 10^6$ spermatozoi/ml) e OAT moderati (campioni con concentrazione spermatica $> 5 \times 10^6$ spermatozoi/ml).
- Normospermici: se i parametri di concentrazione, motilità e morfologia, non presentano nessuna delle alterazioni descritte nei punti precedenti.

In accordo con i parametri precedentemente indicati i 35 pazienti oggetto dello studio sono stati classificati come segue:

| Tipo di traslocazione | Classificazione seme | Concentrazione (Spermatozoi/ml) x 10 ⁶ V.N. ≥ 15x10 ⁶ Sp / ml | Spermatozoi morfologicamente normali (%) V.N. ≥ 14% (secondo Krüger) | Motilità spermatica (%) | |
|----------------------------------|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------|
| | | | | Rapidamente progressiva V.N. ≥ 32 | Totale V.N. ≥ 40% |
| 46 XY t(4;14)(p14;q12) | T | 75 | 8 | 50 | 55 |
| 46 XY t(1;9)(q21;q32) | OAT SEVERO | 0,1 | N.V. | 60 | 70 |
| 45 XY t(14;21)(p11;p11) | OAT | 19 | 11 | 40 | 45 |
| 45, XY, der (13;14) (q10;q10) | AT | 26,4 | 11 | 35 | 40 |
| 46XY t(9;15)(q34;q13) | OAT | 5 | 6 | 20 | 25 |
| 46 XY t(7;17)(q11.2;q12) | OA | 14 | 15 | 25 | 30 |
| 46,XY t(3; 7)(q25; q32) | A | 30 | 17 | 25 | 35 |
| 45,XY t(14;21)(q10;q10) | OAT SEVERO | 3,1 | 4 | 15 | 20 |
| 46,XY t(10;12)(q22;q24.1) | A | 32 | 15 | 30 | 35 |
| 45,XY der(13;14)(q10;q10) | T | 5,5 | 5 | 45 | 50 |
| 45,XY der(13;14)(q10;q10) | T | 38 | 11 | 15 | 20 |
| 45,XY der(13;14)(q10;q10) | AT | 36 | 10 | 20 | 35 |
| 46,XY t(11;22) (q25;q13) | OAT SEVERO | 1,9 | 5 | 15 | 20 |

| Tipo di traslocazione | Classificazione seme | Concentrazione (Spermatozoi/ml) x 10 ⁶ V.N. ≥ 15x10 ⁶ Sp / ml | Spermatozoi morfologicamente normali (%) V.N. ≥ 14% (secondo Krüger) | Motilità spermatica (%) | |
|-------------------------------|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|
| | | | | Rapidamente progressiva V.N. ≥ 32 | Totale V.N. ≥ 40 % |
| 46,XY t(2;11) (q23;p11.2) | AT | 31 | 7 | 25 | 45 |
| 46,XY t(3;4) (q27;q25) | T | 46 | 7 | 45 | 55 |
| 46,XY t(1;10) (q22;q25) | OAT SEVERO | 0,4 | N.V. | 2 | 4 |
| 46,XY t(1;11)(q24;q24) | OAT SEVERO | 4 | 4 | 20 | 30 |
| 46XY t(12;15)(p11;q11) | T | 25 | 7 | 25 | 40 |
| 45,XY der(13;14)(q10;q10) | OAT | 5,3 | 8 | 10 | 25 |
| 45,XY der(13;15)(q10;q10) | AT | 20 | 5 | 0 | 0 |
| 46XY t(1;16)(p22;p13.1) | A | 65 | 16 | 30 | 35 |
| 46XY t(16;20)(p13.3;q13.1) | OAT SEVERO | 0,1 | N.V. | 5 | 15 |
| 46XY t(6;15)(p12;q11.2) | OAT | 9 | 8 | 20 | 30 |
| 45,XY der(13;14)(q10;q10) | A | 40 | 14 | 30 | 35 |
| 46XY t(3;17)(p25;q21) | OAT | 4,5 | 8 | 10 | 20 |
| 46,XY t(2;12)(p21;p13) | A | 57 | 15 | 25 | 35 |
| 46,XY t(2;5)(q35;p15) | OAT | 6 | 14 | 26 | 69 |

| Tipo di traslocazione | Classificazione seme | Concentrazione (Spermatozoi/ml) x 10 ⁶ V.N. ≥ 15x10 ⁶ Sp / ml | Spermatozoi morfologicamente normali (%) V.N. ≥ 14% (secondo Krüger) | Motilità spermatica (%) | |
|--------------------------------|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|
| | | | | Rapidamente progressiva V.N. ≥ 32 | Totale V.N. ≥ 40 % |
| 46,XY t(4;14)(p14;q12) | T | 19 | 8 | 30 | 40 |
| 45,XY der(13;14)(q10;q10) | OAT | 9,3 | 7 | 15 | 25 |
| 46 XY t(Y;15)(q11.23;p11.2) | AT | 29,2 | 4 | 25 | 30 |
| 45,XY rob(13;14)(q10;q10) | OT | 13,4 | 3 | 24 | 64 |
| 46,XY t(2;7)(q31;q32) | T | 41 | 5 | 35 | 45 |
| 46,XY t(9;17)(p24.2;p13.2) | A | 22 | 14 | 20 | 30 |
| 46,XY t(18;21)(q21;p11.2) | AT | 16 | 2 | 5 | 15 |
| 46, XY, t(9;15)(q12;p12) | OAT | 5,1 | 4 | 10 | 15 |

Tabella 1: Caratteristiche dei liquidi seminali utilizzati nello studio.

A = Astenospermici

T = Teratospermici

OAT= Oligoastenoteratospermici

NV =Non valutabile

3.3 Determinazione della morfologia spermatica

Per l'analisi della morfologia, 10 µl di ciascun campione sono stati strisciati su vetrino porta oggetto, con successivo fissaggio mediante Merckofix® Fixationsspray (Merck KGaA). Dopo asciugatura all'aria, è stata eseguita la colorazione con la tecnica Papanicolaou mediante i seguenti passaggi:

- ✓ 5 immersioni in Alcool Etilico 80%, Alcool Etilico 70%, acqua minerale e acqua ultrapura;
- ✓ immersione per 2 minuti in Ematossilina di Harris (Merck KGaA) e successivo risciacquo in acqua minerale;
- ✓ 5 immersioni in Alcool etilico 70%, immersione in HCl 1% + Alcool Etilico 70% (1:1), 5 immersioni in Alcool etilico 70%, Alcool Etilico 70%, immersione in Ammoniaca 3% + Alcool Etilico 70% (1:1), 5 immersioni in Alcool Etilico 70%, Alcool Etilico 80%, Alcool Etilico 95%;
- ✓ Immersione in OG6 per 3 minuti;
- ✓ 5 immersioni in Alcool Etilico 95%, altre 5 immersioni in Alcool Etilico 95%, da 1 a 3 immersioni in Acido Acetico + Alcool Etilico 95% (1:99), 3 immersioni in Acido fosfotungstenico + Alcool Etilico 95% (1 gr di Acido fosfotungstenico in 122 ml di Alcool Etilico 95%), 5 immersioni in Alcool Etilico 95%;
- ✓ immersione in EA-50 (eosina-alcool) (Merck KGaA) per 5 minuti;
- ✓ 5 immersioni in Alcool Etilico 95%, altre 5 immersioni in Alcool Etilico 95%, 10 immersioni in Alcool Etilico 99%;
- ✓ 10 immersioni in Xilene sotto cappa aspirante.

Il vetrino così colorato viene fatto asciugare all'aria e, sotto cappa aspirante, montato con Mounting Medium (Fluka Biochemika) e un vetrino copri-oggetto 24x50 mm, per l'osservazione al microscopio ottico. Viene valutata la morfologia di almeno 100 cellule spermatiche, considerando l'acrosoma

(trasparente), la regione post-acrosomiale (rosa-violacea), la porzione intermedia (rosa-violacea) e la coda.

3.4 Protocollo FISH

3.4.1 Preparazione dei nuclei spermatici

Campioni di liquido seminale con una concentrazione totale superiore a 1 x 10

- ✓ *Lavaggio del campione.* Al campione di eiaculato, opportunamente mantenuto a 37°C, si aggiunge una quantità di PBS 1X pre – riscaldato a 37°C pari al volume di liquido seminale.

Si prosegue omogeneizzando accuratamente la soluzione cercando di rompere eventuali viscosità presenti. La sospensione, successivamente si colloca in una provetta da 10 mL e si identifica con il cognome del paziente, si centrifuga a 3600 rpm per 10 minuti e al termine della stessa si procede eliminando il surnatante e risospendendo il pellet così ottenuto in 1 ml di T6 buffer preriscaldato a 37°C.

Successivamente si esegue una separazione nemaspermica usando 0,5 ml del gradiente al 90% di Pure Sperm (Nidacon) e si stratifica su di esso 1 ml di T6 buffer nel quale è stato risospeso il pellet. Tale campione si centrifuga a 1500 rpm per 20 minuti. Con l'ausilio di una pipetta pasteur si recupera sia il surnatante che il gradiente al 90% e si uniscono in una provetta da 5 ml, facendo attenzione di scartare l'interfase dove si concentrano granuli gelatinosi, cellule leucocitarie, epiteliali uretrali o coaguli di proteine contenute nel liquido seminale. Al surnatante e al gradiente 90% si aggiunge 1 ml di T6 buffer e il tutto si centrifuga a 3600 rpm per 10 minuti.

- ✓ *Fissaggio del campione.* Al termine della centrifugazione il pellet si risospende in 1 ml (0,5 ml se la quantità totale di spermatozoi è \leq di 30×10^6) di fissativo (Metanolo – Acido Acetico 3:1). Nei casi d'oligospermia severa dove sono previste più raccolte, il protocollo prevede l'aggiunta di 100 - 200 μ l di fissativo. Il campione così

ottenuto viene stoccato a -20°C fino al momento dell'analisi cromosomica.

3.4.2 Decondensazione dei nuclei spermatici

Nel caso di pazienti con parametri di oligospermia severa (conta inferiore o uguale a $0,5 \times 10^6$ spermatozoi) il campione fissato viene trasferito in una eppendorf da 1,5 mL e centrifugato a 8000 rpm per 5 minuti. Successivamente viene risospeso in un volume di 100 o 200 µl circa di fissativo, a seconda della quantità di spermatozoi presenti nel campione raccolto. La sospensione così ottenuta si distribuisce su vetrini rivestiti da uno strato di Poly-L-Lys. Per i pazienti con una quantità di spermatozoi maggiore o uguale a 12×10^6 si procede strisciando un opportuno volume della sospensione su un vetrino sgrassato con etanolo a caldo su di una piastra riscaldante a 37°C, in modo tale da avere una quantità totale di spermatozoi compresa tra 3×10^6 e 4×10^6 spermatozoi.

All'avvenuta evaporazione del fissativo, il vetrino viene lavato per 5 min in SSC 2x (Sodio citrato 30 mM + 0,3 M NaCl) e successivamente incubato per 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente nella soluzione decondensante Tris-HCl 0,1 M + DTT 10 mM pH 8.0.

Trascorsi i tempi previsti, il vetrino viene nuovamente lavato per 5 minuti in SSC 2X e successivamente disidratato in una serie di etanoli a concentrazioni progressive (70%, 96%, 96%, 100%, 100%) immergendolo per 5 volte (Martini et. Al. 1995, Human Reproduction vol. 10 no.4)

3.4.3 Denaturazione e ibridazione

- ✓ *Denaturazione dei nuclei spermatici.* Si incuba il vetrino a 76°C per 15 min all'interno di una giara preriscaldata contenente una soluzione di con 50 mL di formamide al 70% preriscaldata a 76°C in SSC 2X e poi si disidrata nella serie degli etanoli (70%, 96%, 96%, 100%, 100%) immergendolo per 5 volte.
- ✓ *Denaturazione delle sonde.* Si dispensano 5 µl della miscela di sonde di DNA specifiche per i cromosomi analizzati e marcate con fluorofori, in un'eppendorf che è stata collocata nel bagnomaria a 76°C per 5 minuti.

Le sonde denaturate si aggiungono al vetrino coprioggetto d'analoghe dimensioni dell'area in cui erano stati distribuiti gli spermatozoi. Successivamente, il vetrino si adagia sul coprioggetto in corrispondenza dell'area d'ibridazione, ricoperto con parafilm e infine incubato in una camera umida ad una temperatura d'ibridazione di 37°C over-night.

Lo studio delle traslocazioni reciproche prevede invece l'utilizzo di due cicli d'ibridazione:

- nel primo ciclo si utilizzano, in genere, le sonde telomeriche;
- nel secondo ciclo si utilizzano le sonde centromeriche;

Per effettuare il secondo ciclo di ibridazione sul medesimo vetrino, lo stesso viene immerso nel bagnomaria a 76°C in modo da poter staccare con facilità il vetrino coprioggetto ed eliminare le sonde che si erano legate nel primo ciclo di ibridazione; successivamente viene effettuato un ulteriore ciclo di denaturazione-ibridazione con le sonde centromeriche.

3.4.4 Caratteristiche delle sonde

Le **sonde telomeriche** sono delle miscele costituite da sequenze di DNA omologhe a specifiche regioni telomeriche, mischiate con sequenze di DNA bloccanti per minimizzare l'ibridazione con altri cromosomi. Le TelVysion sono direttamente marcate con i rispettivi fluorofori SpectrumOrange™, SpectrumGreen™ o SpectrumRed™.

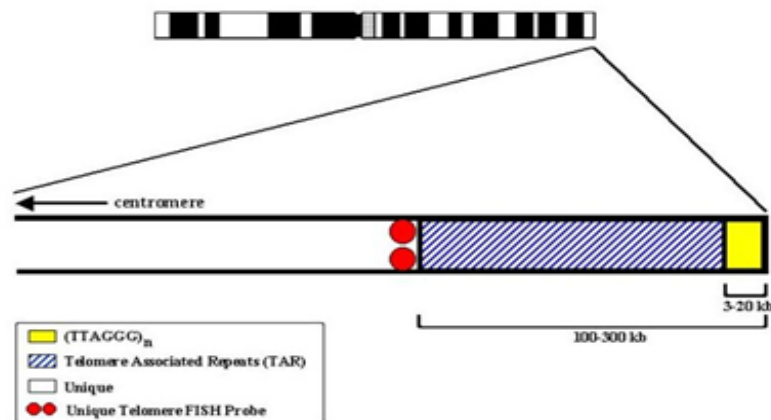


Figura 19 Schematic of the make-up of human chromosome telomeric regions. Diagram courtesy of C. Lese and D. Ledbetter, University of Chicago.

Le sonde **LSI (locus specific identifier)** sono costituite da sequenze di DNA omologhe a specifiche regione di DNA; le sequenze geniche o i loci sono direttamente marcati con uno dei fluorofori. Le sonde **CEP (chromosome enumeration probes)** sono sequenze di DNA ripetute in tandem (alfa-satellite, satellite II o satellite III) cromosoma-specifiche, che si ibridano con le sequenze satellite altamente ripetute nel DNA umano e che di solito sono situate vicino ai centromeri.

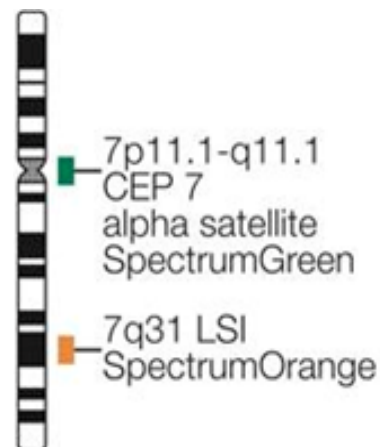


Figura 20

Per lo studio delle traslocazioni reciproche e Robertsoniane, sono stati analizzati i cromosomi 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X, Y utilizzando le sonde commerciali (Vysis e/o Cytocell), indicate nella tabella 2:

| Tipo di traslocazione | Tipo e nome delle sonde utilizzate nel primo ciclo di ibridazione | Tipo e nome delle sonde utilizzate nel secondo ciclo di ibridazione |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| 46,XY,t(9;15)(q34;q13) | Tel 9q SR Tel 15q SO) | CEP 9 SG CEP 15 SO |
| 46,XY,t (10,12)(q22;q24.1) | Tel 10q SO) Tel 12q SG | CEP 10 SG CEP 12 SO |
| 46,XY,t(3;7)(q25; q32) | Tel 3q SG Tel 7q SO | CEP 3 SO CEP 7 SG |
| 46,XY,t(9;15)(q12;p12) | CEP 9 SA CEP 15 SG Tel 9q SO | ----- |
| 46,XY,t(7;17)(q11.2;q12) | Tel 17q SO Tel 7q SR | CEP 7 SG CEP 17 SO |
| 46,XY,t(3;4) (q27;q25) | Tel 3q SG Tel 4q SO | CEP 3 SO CEP 4 SG |
| 46,XY,t(1;11)(q24;q24) | Tel 1q SO Tel 11q SG | CEP 1 SO CEP 11 SG |
| 46,XY,t(11;22) (q25;q13) | Tel 11q SO Tel 22q SG | CEP 11 SO LSI 22 SG |
| 46,XY,t(1;10) (q22;q25) | Tel 1q SO Tel 10q SR | CEP 1 SO CEP 10 SG |
| 46,XY,t(2;11) (q23;p11.2) | Tel 2q SO Tel 11p SG | CEP 2 SO CEP 11 SG |
| 46,XY,t(12;15)(p11;q11) | Tel 12p SG Tel 15q SO | CEP 12 SO CEP 15 SG |

| Tipo di traslocazione | Tipo e nome delle sonde utilizzate nel primo ciclo di ibridazione | Tipo e nome delle sonde utilizzate nel secondo ciclo di ibridazione |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| 46 XY t(4;14)(p14;q12) | Tel 4p SG Tel 14q SO | CEP 4 SG CEP 15 SO |
| 46 XY t(1;9)(q21;q32) | Tel 9q SO Tel 9p SG | Tel 1q SO Tel 1pSG |
| 45 XY t(14;21)(p11;p11) | Tel 14q SO LSI 21 SG | ----- |
| 45,XY,der(13;14)(q10;q10) | LSI 13 SG Tel 14q SO | ----- |
| 45,XY,der(13;15)(q10;q10) | LSI 13 SG Tel 15q SO | ----- |
| 46XY,t(1;16)(p22;p13.1) | Tel 16p SG CEP 16 SA CEP 1 SO | ----- |
| 46XY,t(16;20)(p13.3;q13.1) | Tel 16p SG Tel 20q SO | CEP 16 SA CEP 20 SO |
| 46XY,t(6;15)(p12;q11.2) | Tel 6p SG Tel 15q SO | CEP 6 SO CEP 15 SG |
| 46XY,t(3;17)(p25;q21) | Tel 3p SG Tel 17q SO | CEP 3 SO CEP 17 SG |
| 46,XY,t(2;12)(p21;p13) | Tel 2p SR Tel 12p SG | CEP 2 SO CEP 12 SG |
| 46,XY,t(2;5)(q35;p15) | Tel 2q SO Tel 5p SG | CEP 2 SG Tel 5q SO |
| 46X,t(Y;15)(q11.23;p11.2) | CEP 15 SG Tel 15q SO | CEP Y SO (Locus DYZ1) CEP Y SO (Locus DYZ3) CEP 6 SA |
| 46,XY,t(2;7)(q31;q32) | Tel 29 SG Tel 7q SO | CEP 2 SO CEP 7 SG |
| 46,XY,t(9;17)(p24.2;p13.2) | Tel 9p SG Tel 17p SR | CEP 17 SA CEP 9 SG |
| 46,XY,t(18;21)(q21;p11.2) | Tel 18p SG Tel 21q SO | CEP 18 SA LSI 21 SA |

Tabella 2

t = traslocazione;

der = cromosoma derivato da un riarrangiamento

Per lo studio delle traslocazioni robertsoniane è stato utilizzato un unico ciclo d'ibridazione, mentre per le traslocazioni reciproche sono stati utilizzati due cicli d'ibridazione successivi di cui nel primo si utilizzavano le sonde Tel e nel secondo le sonde CEP e/o LSI.

Nel caso di campioni con concentrazione spermatica $< 12 \times 10^6$ spermatozoi/ml, si è preferito utilizzare la miscela di sonde MultiVysion PB Multi-color, costituito da un mix di 5 sonde di DNA omologhe a specifiche regioni dei cromosomi 13, 16, 18, 21 e 22, e una miscela di quattro sonde specifiche per i cromosomi 15, 17, X e Y da utilizzare su due vetrini o su di uno stesso vetrino in due cicli successivi d'ibridazione.

3.4.5 Lavaggi post ibridazione

Le soluzioni di lavaggio vengono riscaldate mezz'ora prima alla temperatura di 46 °C.

Per le miscele contenenti sonde CEP il protocollo di lavaggio è il seguente:

- ✓ togliere il vetrino copri oggetto;
- ✓ lavare una volta a 46 °C in 50 ml di soluzione SSC 2X al 50 % di formamide per 5 minuti;
- ✓ lavare una volta a 46 °C in 50 ml di soluzione SSC 2X per 5 minuti;
- ✓ lavare una volta a 46 °C in 50 ml di soluzione SSC 2X / 0,1% NP-40 per 5 minuti.

Per le miscele contenenti sonde locus specifiche (LSI 13, LSI 21, LSI 22), telomeriche, miscele di sonde Vysis Multivision PB-Multi-color e miscele contenenti sonde CEP 15, CEP 17, CEP X e CEP Y usate nel secondo ciclo d'ibridazione sulle medesime cellule spermatiche, il protocollo prevede di ridurre i tempi di lavaggio a 1 minuto. Successivamente si procedeo controcolorando i nuclei spermatici aggiungendo al vetrino 5µl d'Antifade (se si utilizzano sonde a DNA marcate con il fluoroforo blue) o DAPI per preservare la fluorescenza delle sonde di DNA.

Infine i vetrini si inseriscono in un contenitore scuro al riparo dalla luce per 5 minuti circa prima di essere osservati i vetrini al microscopio a fluorescenza.

3.4.6 Preparazione delle soluzioni

PBS 10 X

Sciogliere in 800 mL di H₂O:

- 55,0 gr di Na₂PO₄
- 13,5 gr di NaH₂PO₄
- 117,0 gr di NaCl

Portare a pH 7,4 con HCl e aggiungere acqua distillata fino ad un litro.

SSC 20X

Per la preparazione di una soluzione da 0,5 litri pesare:

- 44,12 gr di sodio citrato
- 87,66 gr di NaCl

Sciogliere i sali in 500 ml di acqua.

Preparazione di una soluzione **1M DTT**:

- Aggiungere 6,485 ml di acqua distillata ad una confezione commerciale di DTT (SIGMA) da 1 gr
- Agitare la confezione fino alla completa dissoluzione del composto
- Aliquotare 1mL della soluzione così ottenuta in eppendorf da 1,5 ml
- Conservare a – 20 °C.

Preparazione di una soluzione **1M di Tris-HCl**:

- Sciogliere 7,88 gr in 40 mL di acqua distillata
- Portare il pH della soluzione a 8.0
- Aggiungere acqua distillata fino a 50mL

3.4.7 Microscopio a fluorescenza

I nuclei spermatici marcati con le sonde di DNA sono stati osservati mediante microscopio a fluorescenza BX40 (Olympus) con un set di 5 filtri.

La fluorescenza richiede una luce intensa di breve lunghezza d'onda. Una sorgente impiegata in fluorescenza è la lampada a vapori di mercurio ad alta pressione che, a differenza della lampada ad incandescenza, utilizza il principio della scarica di gas e non presenta uno spettro continuo, ma discreto.

Questa sorgente di luce presenta un globo di quarzo resistente alle alte pressioni, all'interno del quale sono fusi il catodo e l'anodo. La camera di combustione contiene una piccola quantità di mercurio. Con scariche ad alta tensione tra gli elettrodi si innesca un arco voltaico, mantenuto dall'alimentazione elettrica. Il calore prodotto fa evaporare il mercurio generando nella lampada un'enorme sovrappressione. La lampada irraggia una luce molto intensa, che contiene un'alta percentuale di raggi UV. L'energia luminosa irraggiata si concentra in determinate lunghezze d'onda, le cosiddette "linee del mercurio". I fluorocromi assorbono la luce (λ_1) in una ristretta regione spettrale ed emettono luce con lunghezza d'onda maggiore di circa 20 - 50 nanometri (λ_2) secondo quanto formulato dalla legge di Stokes.

Normalmente i microscopi ottici semplici sono provvisti di un obiettivo che raccoglie la luce trasmessa dal campione. In un microscopio a fluorescenza il sistema è strutturato in maniera tale che la luce proveniente dalla sorgente incide sul campione, mentre l'obiettivo raccoglie la luce fluorescente emessa dai coloranti in esso contenuti. Tra l'obiettivo e la lente oculare sono disposte combinazioni di filtri: filtro per il passaggio d'una doppia banda luminosa (Red / Green); filtri per il passaggio d'una singola banda luminosa (Red), (Green), (Blu), (Aqua), (Yellow).

Il filtro di eccitazione lascia passare la luce monocromatica di interesse proveniente dalla sorgente luminosa. Lo specchio dicroico riflette la luce di eccitazione che andrà a colpire il campione e lascia passare quasi completamente la luce di fluorescenza emessa dalla lampada. Il campione eccitato emette con una specifica lunghezza d'onda (maggiore per la legge di Stokes) e il filtro di emissione trasmette la luce fluorescente emessa dal campione filtrando i residui della luce di eccitazione.

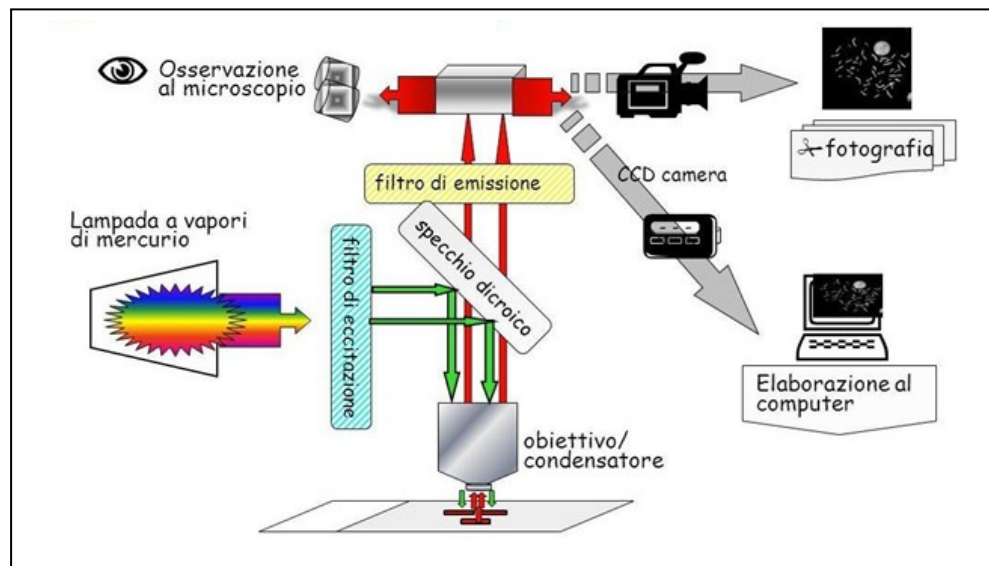


Figura 22 Schema semplificato del funzionamento di un microscopio a fluorescenza



Figura 21 Immagine del microscopio a fluorescenza utilizzato per l'analisi.

3.4.8 Analisi statistica

L'analisi statistica delle differenze tra frequenze d'aneuploidia spermatica nei due gruppi di pazienti portatori di traslocazioni, è stata effettuata utilizzando il test del chi-quadro (χ^2), utilizzando il programma Excel.

Le frequenze medie delle anomalie cromosomiche nelle popolazioni di normospermici sono:

- ✓ frequenza media di disomia per i cromosomi autosomici: 0,13%;
- ✓ frequenza media di disomia per i gonosomi : 0,37%;
- ✓ frequenza media di diploidia: 0,20%.

(Egozcue, 2005; Pre-congress Course 2 – Joint SIG Andrology & Reproductive Genetics. Aneuploidy in human sperm. ESHRE Annual Meeting, Copenhagen).

Considerando un tasso medio di disomia per i cromosomi autosomici dello 0,13% e dei gonosomi dello 0,37%, escludendo quindi una variabilità intercromosomica e inoltre che il tasso d'aneuploidia sia il doppio del tasso di disomia, poiché le nullisomie possono derivare anche da mancate ibridazioni dei cromosomi con le sonde cromosomiche, la frequenza media d'aneuploidia rispetto ai 9 cromosomi analizzati nel nostro studio (13, 16, 18, 21, 22, X, Y, 15, 17) nelle popolazioni di normospermici, risulta essere del 2,56% (ottenuta dalla sommatoria delle aneuploidie dei cromosomi autosomici e quella dei gonosomi: $0,13\% \times 2 \times 7 + 0,37\% \times 2$).

Sulla base di queste considerazioni, le differenze tra le frequenze d'aneuploidia spermatica nei due gruppi di pazienti portatori di traslocazioni rispetto alle frequenze normali di controllo sono considerate statisticamente significative quando il valore di $p < 0,001$. Questa decisione adottata dal centro S.I.S.Me.R. deriva dal fatto che le aneuploide spermatiche sono eventi rari e pertanto, al fine di fornire una diagnosi più corretta, la valutazione statistica è stata corretta per varianti rare.

CAPITOLO IV

Risultati e discussione

4.1 RISULTATI

I liquidi seminali dei 35 pazienti in studio, sono stati trattati per l'analisi delle traslocazioni e delle aneuploidie mediante tecnica FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) come precedentemente descritto.

L'esame al microscopio a fluorescenza ha permesso di osservare all'interno dei nuclei spermatici diverse forme di distribuzione dei segnali fluorescenti, specifici per i cromosomi analizzati.

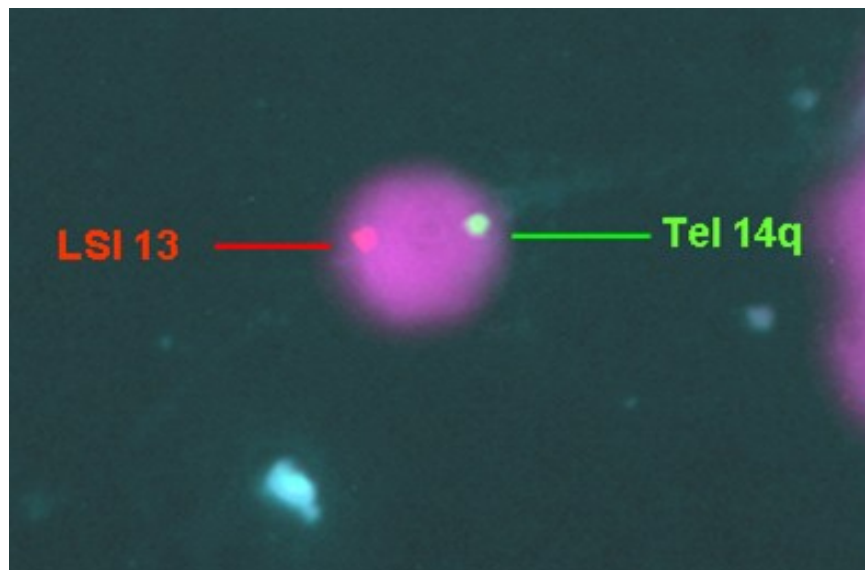


Figura 23 Spermatozoo analizzato utilizzando le sonde di DNA specifiche per la regione telomerica Tel 14q (verde) e la sonda LSI 13 (rosso). Lo spermatozoo risulta essere normale per i cromosomi analizzati (i segnali sono presenti in singola copia).

Nella figura 23 è rappresentato uno spermatozoo, di un paziente affetto da una traslocazione 45,XY,t(13;14)(q10;q10), che è stato analizzato con sonde specifiche per i cromosomi 13 e 14. Lo spermatozoo presenta una traslocazione bilanciata oppure è normale; mentre nell'immagine successiva (figura 24) è rappresentato un spermatozoo del medesimo paziente analizzato per gli stessi cromosomi 13 e 14, ma che presenta una traslocazione robertsoniana.

Nella figura 25 è rappresentato lo stesso spermatozoo studiato per la traslocazione 46,XY,t(1;15)(p31.2;q25.3).

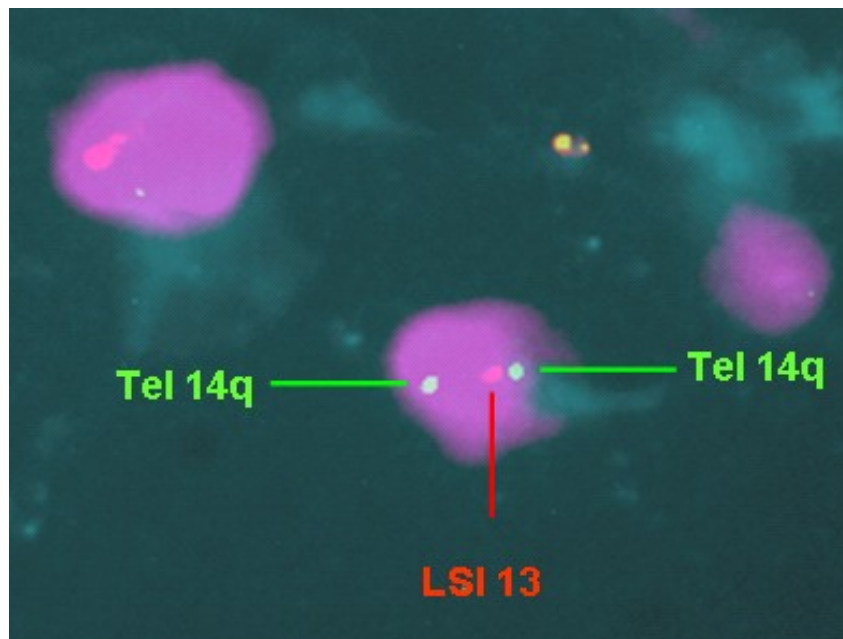


Figura 24 Spermatozoo analizzato utilizzando le sonde di DNA specifiche per la regione telomerica Tel 14q (verde) e la sonda LSI 13 (rosso). Lo spermatozoo presenta un riarrangiamento sbilanciato per la traslocazione robertsoniana 45 XY t(13;14)(q10;q10).

Lo studio è stato effettuato mediante due cicli d'ibridazione: nel primo ciclo di ibridazione sono state utilizzate le sonde di DNA specifiche per la regione telomerica Tel 1p (segnale verde) e telomerica Tel 15q (segnale giallo) mentre nel secondo ciclo di ibridazione sono state utilizzate le sonde centromeriche CEP 1 (segnale giallo) e CEP 15 (segnale verde). Lo spermatozoo presenta un riarrangiamento sbilanciato per la traslocazione reciproca 46 XY t(1;15)(p31.2;q25.3), segregazione 2:2, adiacente I.

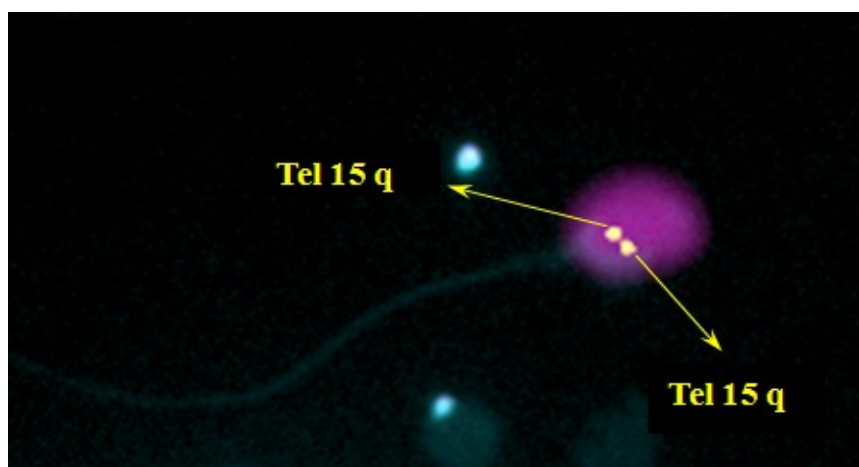


Figura 25 Lo stesso spermatozoo analizzato utilizzando le sonde centromeriche specifiche per i cromosomi CEP 1 (giallo) e CEP 15 (verde). Lo spermatozoo presenta un riarrangiamento sbilanciato per la traslocazione reciproca 46 XY t(1;15)(p31.2;q25.3) (Segregazione 2:2, Adiacente I).

I campioni di spermatozoi dei due gruppi di pazienti portatori di traslocazioni robertsoniane e reciproche in studio sono stati analizzati anche per le aneuploidie relative ai cromosomi X, Y, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22. Le figure 26, 27 e 28 riportano rispettivamente esempi di spermatozoi normospermici, disomici e diploidi.

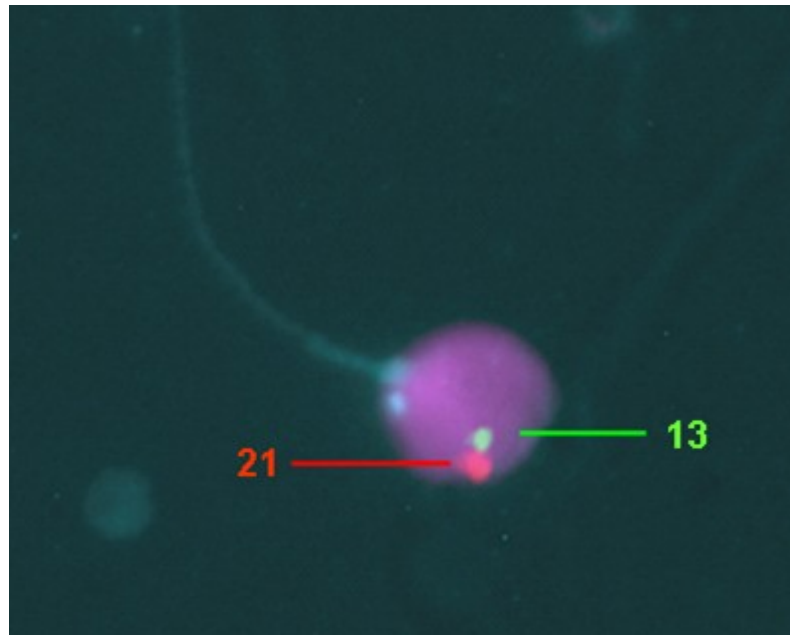


Figura 26 Spermatozoo analizzato utilizzando le sonde di DNA specifiche per i cromosomi 13 (verde) e 21 (rosso). Lo spermatozoo è normale per i cromosomi analizzati (i segnali sono presenti in singola copia).

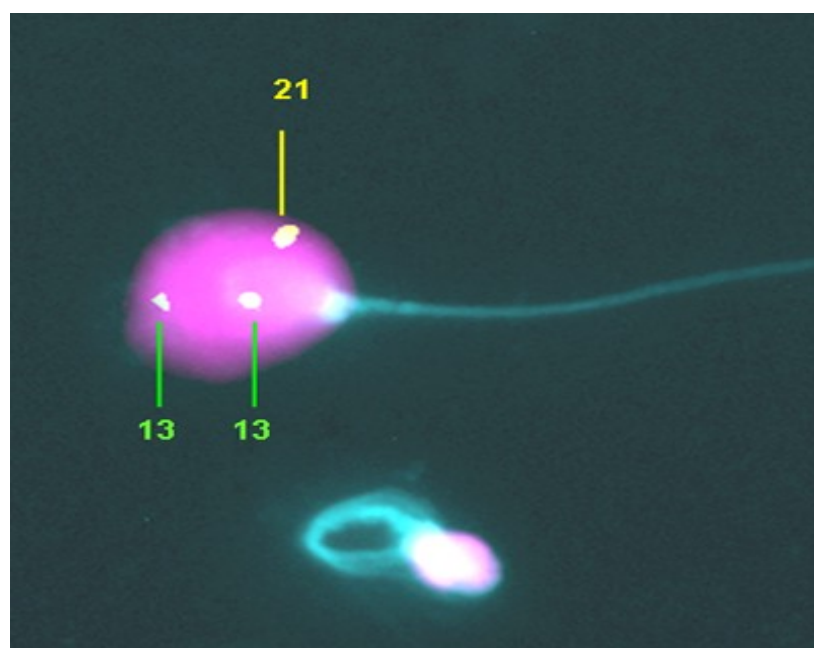


Figura 27 Spermatozoo analizzato utilizzando le sonde di DNA specifiche per i cromosomi 13 (verde) e 21 (giallo). Lo spermatozoo presenta una disomia per il cromosoma 13 (i segnali sono presenti in duplice copia).

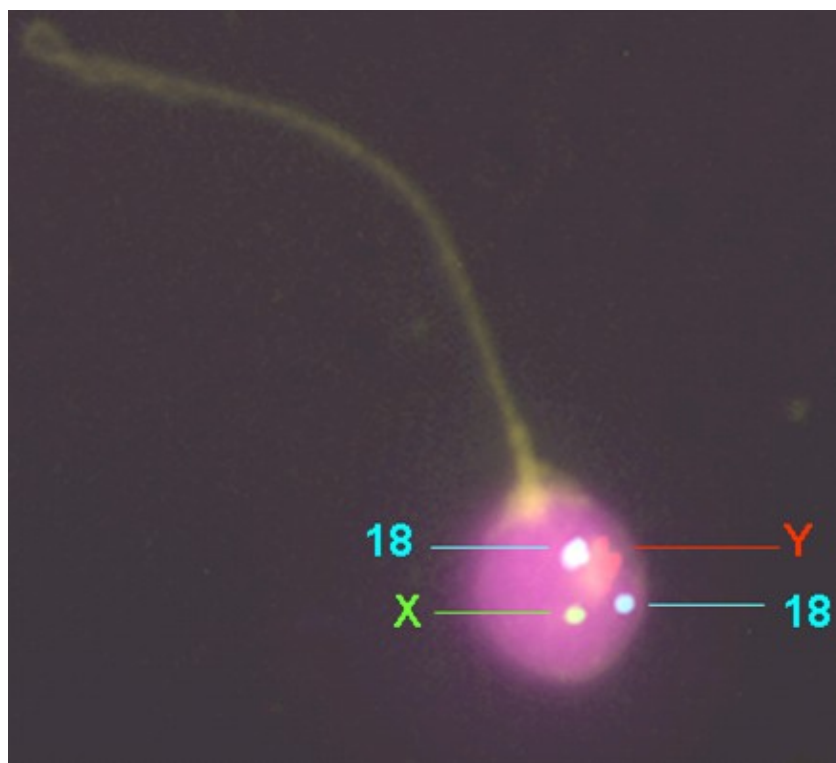


Figura 28 Spermatozoo analizzato utilizzando le sonde di DNA specifiche per i cromosomi X (verde), Y(rosso) e 18 (azzurro). Lo spermatozoo è diploide (i segnali sono presenti in duplice copia).

Come precedentemente indicato per i casi di oligospermia severa sono state utilizzate le miscele di 4 sonde specifiche per i cromosomi X, Y, 15 e 17 e le miscele di 5 sonde MultiVysion PB Multi-color relative ai cromosomi 13, 16, 18, 21 e 22 .

Di seguito, nella figura 29 è riportato un esempio di spermatozoo normale per i cromosomi suddetti in due cicli d'ibridazione successivi; nella figura 30 è mostrato invece uno spermatozoo analizzato con la miscela MultiVysion PB Multi-color, che presenta una disomia per il cromosoma 16.

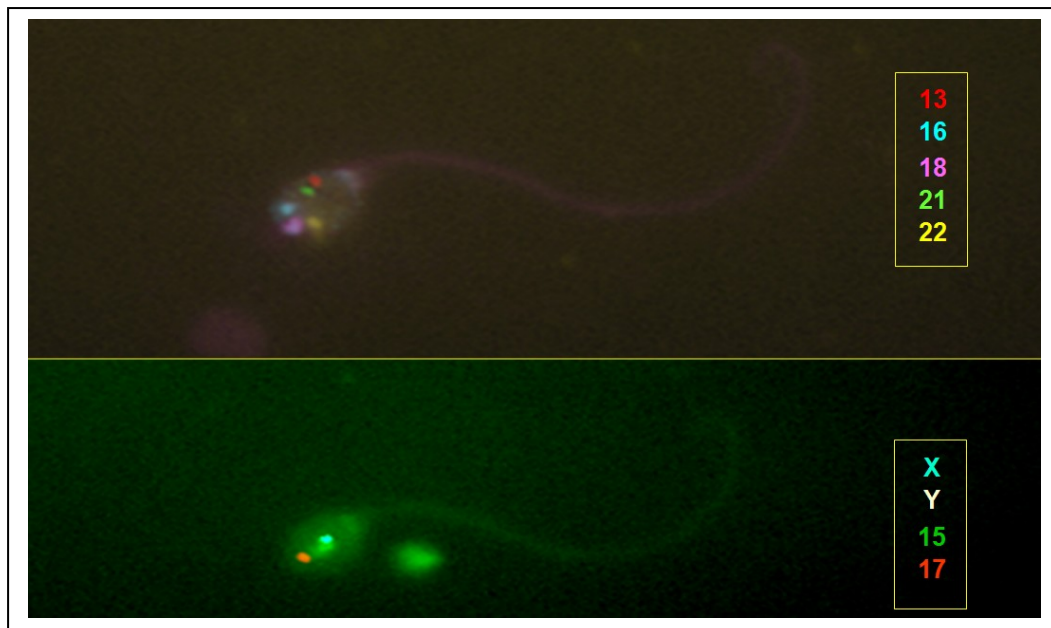


Figura 29 Lo stesso spermatozoo analizzato utilizzando la miscela di 5 sonde MultiVysion PB Multi-color specifiche per i cromosomi 13 (rosso), 16 (azzurro), 18 (viola), 21 (verde) e 22 (giallo) e la miscela di 4 sonde specifiche per i cromosomi X (azzurro), Y (bianco), 15 (verde) e 17 (rosso). Lo spermatozoo risulta essere normale per i cromosomi analizzati (i segnali sono presenti in singola copia).
Immagine tratta da: Gianaroli L, Magli MC, Cavallini G, Crippa A, Nadalini M, Bernardini L, Menchini-Fabris F, Voliani S, Ferraretti AP. (2005) Frequency of aneuploidy in sperm from patients with extremely severe male factor infertility. *Hum Reprod* 20, 2140-2152.

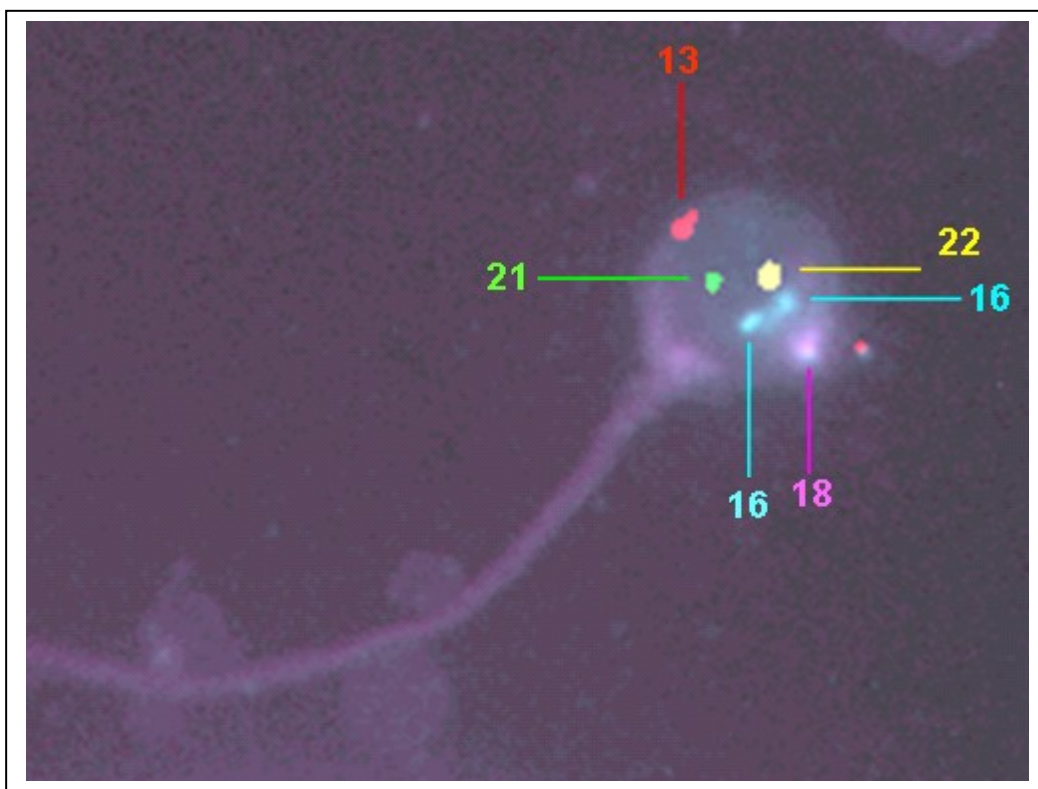


Figura 30 Spermatozoo analizzato utilizzando la miscela di 5 sonde MultiVysion PB Multi-color specifiche per i cromosomi 13 (rosso), 16 (azzurro), 18 (viola), 21 (verde) e 22 (giallo). Lo spermatozoo presenta una disomia per il cromosoma 16 (i segnali sono presenti in duplice copia).

I risultati ottenuti dall' analisi delle traslocazioni sono mostrati nelle tabelle 3 e 4 nella quali sono riportati la tipologia di traslocazione e il numero totale di cellule sbilanciate intese come rapporto tra il numero di cellule traslocate rispetto al numero totale di cellule contate per ogni singola traslocazione in esame.

| TRASLOCAZIONI ROBERTSONIANE | Traslocazioni | Cellule sbilanciate | Cellule contate | % |
|--------------------------------|------------------------------|------------------------|--------------------|-------|
| | 45 XY t(14;21)(p11;p11) | 25 | 425 | 5,88 |
| | 45, XY, der(13;14) (q10;q10) | 49 | 206 | 23,79 |
| | 45,XY,t(14;21)(q10;q10) | 58 | 800 | 7,25 |
| | 45,XY,der(13;14)(q10;q10) | 78 | 800 | 9,75 |
| | 45,XY,der(13;14)(q10;q10) | 95 | 800 | 11,88 |
| | 45,XY,der(13;14)(q10;q10) | 129 | 800 | 16,13 |
| | 45,XY,der(13;14)(q10;q10) | 186 | 800 | 23,25 |
| | 45,XY,der(13;15)(q10;q10) | 105 | 1555 | 6,75 |
| | 45,XY,der(13;14)(q10;q10) | 134 | 800 | 16,75 |
| | 45,XY,der(13;14)(q10;q10) | 262 | 800 | 32,75 |
| | 45,XY,rob(13;14)(q10;q10) | 233 | 800 | 29,13 |

Tabella 3 Tipologia di traslocazione robertsoniana e relativo numero di cellule sbilanciate

| TRASLOCAZIONI RECIPROCHE | Traslocazioni | Cellule sbilanciate | Cellule contate | % |
|--------------------------|----------------------------|---------------------|-----------------|-------|
| | 46 XY t(4;14)(p14;q12) | 20 | 201 | 9,95 |
| | 46 XY t(1;9)(q21;q32) | 6 | 26 | 23,08 |
| | 46 XY, t(9;15)(q34;q13) | 175 | 208 | 84,13 |
| | 46 X,t(Y;15)(q11.23;p11.2) | 163 | 208 | 78,37 |
| | 46, XY, t(9;15)(q12;p12) | 114 | 208 | 54,81 |
| | 46 XY, t(7;17)(q11.2;q12) | 129 | 208 | 62,02 |
| | 46,XY,t(3; 7)(q25; q32) | 159 | 204 | 77,94 |
| | 46,XY,t(10;12)(q22;q24.1) | 130 | 207 | 62,80 |
| | 46,XY t(11;22) (q25;q13) | 139 | 208 | 66,83 |
| | 46,XY t(2;11) (q23;p11.2) | 153 | 208 | 73,56 |
| | 46,XY t(3;4) (q27;q25) | 158 | 208 | 75,96 |
| | 46,XY t(1;10) (q22;q25) | 159 | 208 | 76,44 |
| | 46,XY,t(1;11)(q24;q24) | 165 | 208 | 79,33 |
| | 46XY,t(12;15)(p11;q11) | 154 | 208 | 74,04 |
| | 46XY,t(1;16)(p22;p13.1) | 64 | 200 | 32,00 |
| | 46XY,t(16;20)(p13.3;q13.1) | 89 | 128 | 69,53 |
| | 46XY,t(6;15)(p12;q11.2) | 33 | 233 | 14,16 |
| | 46XY,t(3;17)(p25;q21) | 106 | 310 | 34,19 |
| | 46,XY,t(2;12)(p21;p13) | 148 | 201 | 73,63 |
| | 46,XY,t(2;5)(q35;p15) | 150 | 208 | 72,12 |
| | 46,XY,t(4;14)(p14;q12) | 151 | 208 | 72,60 |
| | 46,XY,t(2;7)(q31,q32) | 190 | 225 | 84,44 |
| | 46,XY,t(9;17)(p24.2;p13.2) | 164 | 208 | 78,85 |
| | 46,XY,t(18;21)(q21;p11.2) | 160 | 202 | 79,21 |

Tabella 4 Tipologia di traslocazione reciproca e relativo numero di cellule sbilanciate

La tabella relativa alle traslocazioni robertsoniane mostra che la frequenza media di cellule sbilanciate è pari al 16,66% (range 5,88% - 32,75%), mentre per quanto

riguarda le traslocazioni reciproche la frequenza media di cellule sbilanciate è pari al 62,92% (range 9,95% - 84,44%).

Dopo aver calcolato la frequenza media di cellule sbilanciate, è stato effettuato uno studio delle frequenze d'aneuploidia dei cromosomi non coinvolti nelle traslocazioni robertsoniane e reciproche. Le frequenze d'aneuploidia, espresse come rapporto percentuale tra il numero delle cellule aneuploidi per cromosoma analizzato, rispetto al numero di cellule totali analizzate, sono state confrontate rispetto alla popolazione normale di controllo. I risultati ottenuti sono riportati nelle tabelle 5 e 6. L'ultima colonna delle tabelle rappresenta la percentuale d'aneuploidia totale, espressa come somma delle nullisomie e delle disomie, relative ai cromosomi analizzati per ognuna delle traslocazioni studiate.

| Tipologia di traslocazione | XY (%) | 13 (%) | 15 (%) | 16 (%) | 17 (%) | 18 (%) | 21 (%) | 22 (%) | Totale cellule spermatiche aneuploidi (%) |
|----------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------------------------------|
| 45 XY t(14;21)(p11;p11) | 8/811 (0,99) | 1/815 (0,12) | 4/808 (0,49) | 4/810 (0,49) | 4/808 (0,49) | 3/811 (0,37) | | 4/810 (0,49) | 28/3244 (0,86) |
| 45, XY, der (13;14) (q10;q10) | 13/800 (1,62) | | 3/800 (0,37) | 3/800 (0,37) | 10/800 (1,25) | 0/800 (0) | 2/800 (0,25) | 9/800 (1,12) | 40/3200 (1,25) |
| 45,XY, t(14;21)(q10;q10) | 20/864 (2,31) | 27/877 (3,08) | 25/864 (2,90) | 6/877 (0,68) | 16/864 (1,85) | 10/877 (1,14) | | 15/877 (1,71) | 119/1741 (6,83) |
| 45,XY, der(13;14)(q10;q10) | 9/800 (1,12) | | 12/800 (1,5) | 8/800 (1,00) | 9/800 (1,12) | 5/800 (0,62) | 32/800 (4,00) | 5/800 (0,62) | 80/3200 (2,5) |
| 45,XY, der(13;14)(q10;q10) | 18/800 (2,25) | | 15/800 (1,87) | 7/800 (0,87) | 13/800 (1,62) | 10/800 (1,25) | 24/800 (3,00) | 9/800 (1,12) | 96/3200 (3,00) |
| 45,XY,der(13;14)(q10; q10) | 21/865 (2,43) | | 22/865 (2,54) | 12/872 (1,38) | 21/865 (2,43) | 12/872 (1,38) | 17/872 (1,95) | 8/872 (0,92) | 113/1737 (6,50) |

| Tipologia di traslocazione | XY (%) | 13 (%) | 15 (%) | 16 (%) | 17 (%) | 18 (%) | 21 (%) | 22 (%) | Totale cellule spermatiche aneuploidi (%) |
|-------------------------------|------------------|--------|------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------------------------------|
| 45,XY, der(13;14)(q10;q10) | 9/800 (1,12) | | 13/800 (1,62) | 13/800 (1,62) | 6/800 (0,75) | 4/800 (0,5) | 11/800 (1,37) | 17/800 (2,12) | 73/3200 (2,28) |
| 45,XY, der(13;14)(q10;q10) | 19/800 (2,37) | | 4/800 (0,5) | 6/800 (0,75) | 46/800 (5,75) | 12/800 (1,5) | 17/800 (2,12) | 31/800 (3,88) | 135/4000 (3,37) |
| 45,XY, der(13;14)(q10;q10) | 2/803 (0,25) | | 31/800 (3,87) | 9/800 (1,12) | 19/800 (2,37) | 1/803 (0,12) | 26/800 (3,25) | 22/800 (2,75) | 110/3203 (3,43) |
| 45,XY, der(13;15)(q10;q10) | 9/806 (1,12) | | | 11/800 (1,37) | 6/800 (0,75) | 5/806 (0,62) | 43/800 (5,37) | 14/800 (1,75) | 88/3206 (2,74) |
| 45,XY, rob(13;14)(q10;q10) | 5/801 (0,62) | | 3/800 (0,37) | 4/800 (0,5) | 6/800 (0,75) | 3/801 (0,37) | 39/800 (4,87) | 2/800 (0,25) | 62/3201 (1,94) |

Tabella 5 Analisi delle frequenze d'aneuploidia dei cromosomi non coinvolti nelle traslocazioni robertsoniane. L'ultima colonna della tabella rappresenta la percentuale d'aneuploidia totale, espressa come somma delle nullisomie e delle disomie relative ai cromosomi analizzati per ognuna delle traslocazioni studiate.

| Tipologia di traslocazione | XY (%) | 13 (%) | 15 (%) | 16 (%) | 17 (%) | 18 (%) | 21 (%) | 22 (%) | Totale cellule spermatiche aneuploidi (%) |
|----------------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------------------------------------------------|
| 46 XY t(4;14)(p14;q12) | 8/811 (0,99) | 2/806 (0,25) | 4/806 (0,50) | 8/812 (0,98) | 2/806 (0,25) | 1/811 (0,12) | 2/806 (0,25) | 4/812 (0,49) | 31/3235 (0,96) |
| 46 XY t(1;9)(q21;q32) | 2/102 (1,96) | 1/107 (0,93) | 1/110 (0,90) | 2/111 (1,80) | 1/110 (0,90) | 0/102 (0) | 2/107 (1,87) | 1/111 (0,90) | 10/430 (2,32) |
| 46 XY, t(9;15)(q34;q13) | 52/800 (6,5) | 23/800 (2,87) | | 33/800 (4,12) | 12/800 (1,5) | 13/800 (1,62) | 26/800 (3,25) | 29/800 (3,62) | 21/3200 (0,66) |
| 46 X,t(Y;15)(q11.23;p11.2) | | 5/800 (3,12) | | 6/800 (0,75) | 8/800 (1,00) | 6/811 (0,74) | 3/800 (0,37) | 8/800 (1,00) | 251/3211 (7,82) |
| 46,XY,t(10;12)(q22;q24.1) | 6/800 (0,75) | 11/800 (1,37) | 9/800 (1,12) | 9/800 (1,12) | 3/800 (0,37) | 3/800 (0,37) | 4/800 (0,50) | 5/800 (0,62) | 50/3200 (1,56) |
| 46 XY, t(7;17)(q11.2;q12) | 9/800 (1,12) | 5/800 (0,62) | 7/800 (0,87) | 5/800 (0,62) | | 2/800 (0,25) | 2/800 (0,25) | 3/800 (0,37) | 38/3200 (1,19) |
| 46, XY, t(9;15)(q12;p12) | 18/878 (2,05) | 20/865 (2,31) | | 4/865 (0,46) | 25/878 (2,85) | 7/865 (0,81) | 19/865 (2,20) | 13/865 (1,50) | 138/1743 (7,92) |

| Tipologia di traslocazione | XY (%) | 13 (%) | 15 (%) | 16 (%) | 17 (%) | 18 (%) | 21 (%) | 22 (%) | Totale cellule spermatiche aneuploidi (%) |
|----------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|----------------------------------------------------|
| 46,XY,t(3; 7)(q25; q32) | 6/800 (0,75) | 8/800 (1,00) | 7/800 (0,87) | 3/800 (0,37) | 3/800 (0,37) | 1/800 (0,12) | 3/800 (0,37) | 3/800 (0,37) | 34/3200 (1,06) |
| 46,XY,t(3;4) (q27;q25) | 6/800 (0,75) | 7/800 (0,87) | 4/800 (0,50) | 6/800 (0,75) | 5/800 (0,62) | 3/800 (0,37) | 13/800 (1,62) | 7/800 (0,87) | 51/3200 (1,60) |
| 46,XY,t(1;11)(q24;q24) | 16/852 (1,88) | 6/824 (0,72) | 17/852 (2,00) | 3/824 (0,36) | 17/852 (2,00) | 5/824 (0,60) | 4/824 (0,49) | 6/824 (0,72) | 74/1676 (4,41) |
| 46,XY,t(11;22) (q25;q13) | 19/800 (2,37) | 28/800 (3,50) | 18/800 (2,25) | 23/800 (2,87) | 25/800 (3,12) | 2/800 (0,25) | 16/800 (2,00) | | 386/3200 (12,06) |
| 46,XY,t(1;10) (q22;q25) | 9/442 (2,03) | 13/452 (2,88) | 19/442 (4,30) | 10/452 (2,21) | 13/442 (2,84) | 8/452 (1,77) | 12/452 (2,65) | 7/452 (1,55) | 91/894 (10,18) |
| 46,XY,t(2;11) (q23;p11.2) | 13/800 (1,62) | 4/800 (0,50) | 7/800 (0,87) | 3/800 (0,37) | 7/800 (0,87) | 4/800 (0,50) | 3/800 (0,37) | 6/800 (0,75) | 47/3200 (1,47) |

| Tipologia di traslocazione | XY (%) | 13 (%) | 15 (%) | 16 (%) | 17 (%) | 18 (%) | 21 (%) | 22 (%) | Totale cellule spermatiche aneuploidi (%) |
|-----------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|----------------------------------------------------|
| 46XY,t(12;15)(p11;q11) | 6/800 (0,75) | 7/800 (0,87) | | 13/800 (1,62) | 9/800 (1,12) | 3/800 (0,37) | 10/800 (1,25) | 12/800 (1,50) | 97/3200 (3,03) |
| 46,XY,t(4;14)(p14;q12) | 6/800 (0,75) | 13/800 (1,62) | 7/800 (0,87) | 5/800 (0,62) | 12/800 (1,50) | 2/800 (0,25) | 22/800 (2,75) | 9/800 (1,12) | 76/3200 (2,37) |
| 46XY,t(3;17)(p25;q21) | 3/805 (0,37) | 13/800 (1,62) | 5/800 (0,62) | 4/800 (0,50) | | 2/805 (0,25) | 31/800 (3,87) | 25/800 (3,12) | 188/3200 (5,87) |
| 46XY,t(16;20)(p13.3;q13.1) | 61/796 (7,67) | 13/506 (2,57) | 40/796 (5,02) | | 49/796 (6,15) | 7/506 (1,38) | 22/506 (4,35) | 18/506 (3,56) | 224/1302 (17,20) |
| 46,XY,t(2;5)(q35;p15) | 8/800 (1,00) | 6/800 (0,75) | 6/800 (0,75) | 4/800 (0,50) | 14/800 (1,75) | 2/800 (0,25) | 11/800 (1,37) | 4/800 (0,50) | 55/3200 (1,72) |
| 46XY,t(6;15)(p12;q11.2) | 9/806 (1,12) | 7/800 (0,87) | | 7/800 (0,87) | 26/800 (3,25) | 3/806 (0,37) | 4/800 (0,50) | 9/800 (1,12) | 196/3206 (6,05) |
| 46XY,t(1;16)(p22;p13.1) | 1/800 (0,12) | 17/800 (2,12) | 7/800 (0,87) | | 7/800 (0,87) | 1/800 (0,12) | 30/800 (3,75) | 12/800 (1,5) | 158/3200 (4,94) |

| Tipologia di traslocazione | XY (%) | 13 (%) | 15 (%) | 16 (%) | 17 (%) | 18 (%) | 21 (%) | 22 (%) | Totale cellule spermatiche aneuploidi (%) |
|-----------------------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|----------------------------------------------------|
| 46,XY,t(2;12)(p21;p13) | 7/800 (0,87) | 5/800 (0,62) | 6/800 (0,75) | 5/800 (0,62) | 3/800 (0,37) | 0/800 (0) | 6/800 (0,75) | 4/800 (0,50) | 36/3200 (1,12) |
| 46,XY,t(9;17)(p24.2;p13.2) | 32/800 (4,00) | 50/800 (6,25) | 87/800 (10,88) | 10/800 (1,25) | | 3/800 (0,37) | 35/800 (4,37) | 36/800 (4,50) | 253/3200 (7,91) |
| 46,XY,t(18;21)(q21;p11.2) | 17/800 (2,12) | 18/800 (2,25) | 40/800 (5,00) | 6/800 (0,75) | 8/800 (1,00) | | | 32/800 (4,00) | 121/3200 (3,78) |
| 46,XY,t(2;7)(q31;q32) | 15/800 (1,87) | 17/800 (2,12) | 7/800 (0,87) | 7/800 (0,87) | 22/800 (2,75) | 2/800 (0,25) | 17/800 (2,12) | 12/800 (1,50) | 99/800 (3,09) |

Tabella 6 Analisi delle frequenze d'aneuploidia dei cromosomi non coinvolti nelle traslocazioni reciproche. L'ultima colonna della tabella rappresenta la percentuale d'aneuploidia totale, espressa come somma delle nullisomie e delle disomie relative ai cromosomi analizzati per ognuna delle traslocazioni studiate

Per valutare i cromosomi maggiormente alterati non coinvolti nelle traslocazioni, è stata valutata la frequenza d'aneuploidia dei medesimi all'interno dei due gruppi di pazienti portatori delle due tipologie di riarrangiamenti cromosomici bilanciati. I risultati ottenuti sono riportati nel grafico 1.

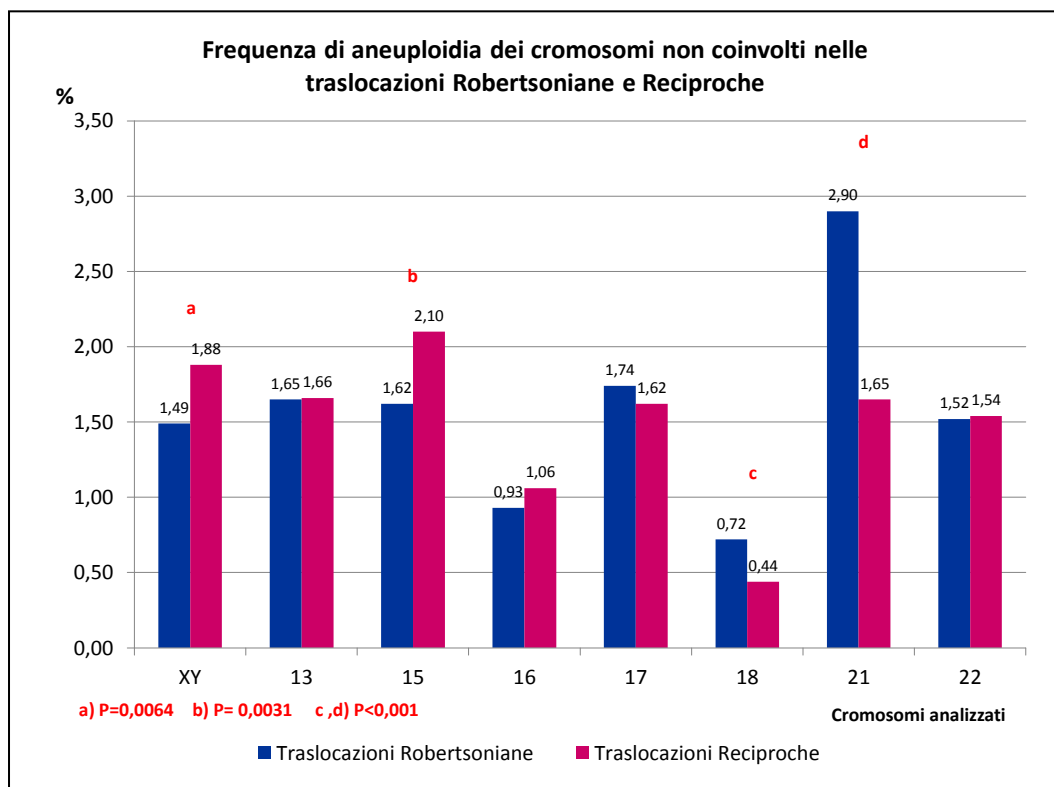


Grafico 1

I due gruppi di pazienti affetti da questi riarrangiamenti strutturali bilanciati, sono stati suddivisi in base alle caratteristiche dei loro liquidi seminali (vedi tabella 8) in OAT moderati, ventinove pazienti (20 pazienti portatori di traslocazioni reciproche e 9 robertsoniane) e OAT severi, 6 pazienti (5 pazienti portatori di traslocazioni reciproche e 1 paziente portatore da traslocazione robertsoniana).

Nel gruppo degli OAT severi, la frequenza totale di aneuploidia (disomia + nullisomia) per i cromosomi non coinvolti nei riarrangiamenti cromosomici (media \pm ds) ($7.33 \pm 5.10\%$, con valori compresi tra 2,32 - 16,13%) era

significativamente maggiore rispetto a quella relativa ai campioni OAT moderati ($2,67 \pm 1,81\%$, con valori compresi tra $0,76 - 7,91\%$) ($P=0.0076$).

| Pazienti | Aneuploidia totale (%) |
|--------------------|-------------------------------------------------|
| OAT Moderato 29 | $2,67 \pm 1,81$ Range (0,76 – 7,91)* |
| OAT Severo 6 | $7,33 \pm 5,10$ Range (2,32 – 16,13)* |

* $P=0,0076$

Tabella 7 Frequenza di Aneuploidia totale per i cromosomi non coinvolti nelle traslocazioni.

Per quanto riguarda le frequenze d'aneuploidia relative ai singoli cromosomi analizzati, i campioni di seme OAT severi rispetto a quelli moderati, mostravano un aumento d'incidenza per i gonosomi ($3,29\%$ vs $1,48\%$) e per i cromosomi 13 ($2,47\%$ vs $1,49\%$), 15 ($3,10\%$ vs $1,68\%$), 16 ($1,44\%$ vs $0,95\%$), 17 ($3,13\%$ vs $1,41\%$), 18 ($0,90\%$ vs $0,48\%$) ($P<0,001$) e 22 ($1,70\%$ vs $1,52$) ($P=0,033$). La frequenza di aneuploidia per il cromosoma 21 non varia tra i campioni OAT severi e moderati ($2,08\%$ vs $1,95\%$) ($P=0,42$). (Grafico 2)

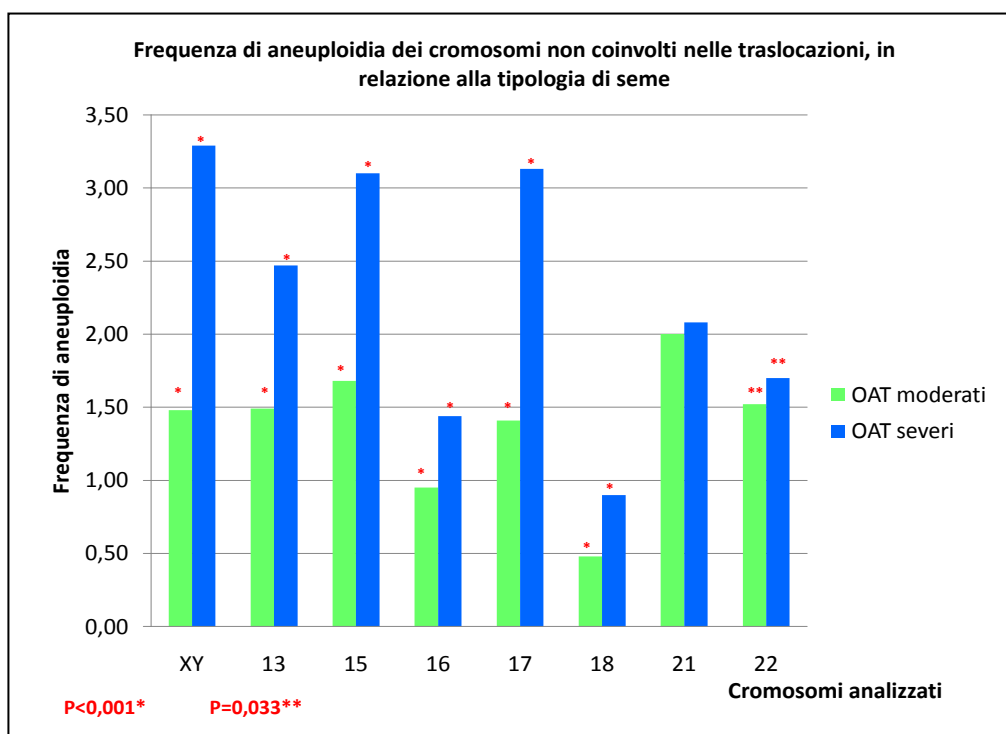


Grafico 2

4.2 DISCUSSIONE

La meiosi è un processo finemente regolato. Uno stadio molto importante è la profase I, nella quale si realizza il riconoscimento tra coppie di cromosomi omologhi che si fondono (sinapsi) grazie alla presenza di un complesso proteico, chiamato complesso sinaptonemale. Successivamente alla sinapsi, nello stadio di pachitene, avviene poi il crossing-over, che comporta lo scambio d'alleli a livello dello stesso locus, in ogni tetrad avviene almeno un crossing-over e lo scambio di materiale genetico avviene solo tra i cromatidi dei cromosomi omologhi appaiati in seguito alla sinapsi. La presenza di riorganizzazioni o alterazioni a livello cromosomico ostacola sia il riconoscimento tra cromosomi omologhi che la successiva distribuzione derivata dal crossing-over (Joyce e McKim 2010; 2011).

Tale situazione può compromettere la fertilità e determinare due conseguenze fondamentali:

- ✓ una anormale progressione della meiosi; per portare a termine la sinapsi durante la profase I della meiosi, i cromosomi riarrangiati adottano complesse geometrie di appaiamento che possono promuovere la comparsa di regioni in cui il processo di sinapsi non si realizza (Oliver-Bonet et al. 2005).
- ✓ Produzione di gameti sbilanciati; la produzione di una certa quantità di spermatozoi con squilibri cromosomici si ripercuote in maniera negativa anche sulla fertilità dei soggetti colpiti da riorganizzazioni cromosomiche strutturali. Tali squilibri derivano principalmente dal verificarsi, nei cromosomi riarrangiati, di alcune modalità di segregazione sbilanciate.

È inoltre noto, in letteratura, che questi riarrangiamenti possono perturbare gli eventi di disgiunzione e segregazione anche di altre coppie di cromosomi, concorrendo così a favorire lo svilupparsi di anomalie numeriche nei gameti risultanti. Questo fenomeno di interferenza cromosomica è anche noto come effetto intercromosomico (ICE). Già nel 1963 Lejeune aveva proposto, nei suoi lavori scientifici, l'esistenza dell' ICE (Lejeune 1963) dopo aver rilevato un

aumento della frequenza di portatori di traslocazioni reciproche tra i padri di bambini con sindrome di Down.

L'insorgenza di tali disturbi è legata alla formazione di eterosinapsi tra le configurazioni meiotiche sviluppate dai cromosomi coinvolti nella riorganizzazione che, come detto in precedenza, normalmente presentano regioni in cui non si sviluppano sinapsi, e altre regioni sensibili del genoma (Guichaoua et al. 1990; Cheng et al. 1999; Oliver-Bonet et al. 2005). Alcune regioni genomiche mostrano una maggiore propensione ad essere coinvolte in queste sinapsi irregolari; tali regioni possono essere o quelle con una maggiore tendenza all'eterosinapsi (che sono rappresentate ad esempio dai bracci corti dei cromosomi acrocentrici e dai cromosomi sessuali) o quelle che presentano lacune o interruzioni nel complesso sinaptonemale (Codina-Pascual et al. 2006).

Alcuni studi hanno correlato il verificarsi di queste interazioni eterosinaptiche intercromosomiche con fenomeni di arresto meiotico (Gabriel-Robez et al. 1986; Johannisson et al. 1987) e hanno dimostrato come tali eventi sono correlati con un'alterazione dei parametri seminali, caratteristica che di fatto accumuna i soggetti portatori di riorganizzazioni cromosomiche strutturali (De Braekeleer and Dao 1991). Tuttavia, è stato anche ipotizzato che, il verificarsi di eterosinapsi sia un meccanismo cellulare volto a salvare l'arresto meiotico che sarebbe inevitabilmente causato dalla presenza di regioni prive di sinapsi (Chandley et al. 1986; Saadallah Hultén e 1986; Navarro et al. 1991). Quello che risulta da queste interazioni si traduce in un aumento significativo delle anomalie cromosomiche numeriche nelle cellule risultanti che quindi concorrono a rappresentare una fonte supplementare di squilibrio cromosomico nei portatori di tali riorganizzazioni strutturali. Sono stati condotti diversi studi per valutare la presenza di ICE analizzando le frequenze numeriche di anomalie nei gameti mediante ibridazione fluorescente in situ (FISH). I dati presenti in letteratura hanno mostrato risultati divergenti in merito all'effettiva evidenza di un effetto intercromosomico nei soggetti portatori di traslocazioni.

Alcuni autori hanno osservato un aumento significativo di anomalie numeriche per molti dei cromosomi analizzati (Rousseaux et al. 1995a; Rousseaux et al. 1995b; Blanco et al. 1998; Mercier et al. 1998; Blanco et al. 2000; Morel et al. 2001; Baccetti et al. 2002; Anton et al. 2004a; Anton et al. 2004b; Morel et al. 2004; Baccetti et al. 2005; Anton et al. 2006; Chen et al. 2007; Juchniuk de Vozzi et al. 2009; Anton et al. 2010; Pellestor et al. 2011; Vozdova et al. 2011b) altri invece non sono in accordo con i precedenti (Martini et al. 1998; Honda et al. 1999; Estop et al. 2000; Rives et al. 2003; Mikhaail-Philips et al. 2004; Oliver-Bonet et al. 2004; Mikhaail-Philips et al. 2005; Hatakeyama et al. 2006; Kekesi et al. 2007; Vialard et al. 2007). La maggior parte degli studi condotti riguarda i cromosomi sessuali, a causa delle loro singolari caratteristiche che li rendono particolarmente inclini ad essere coinvolti nei processi di eterosinapsi, e i cromosomi 13, 18, 21.

Nello studio da noi condotto, si è voluto determinare l'effetto intercromosomico nei pazienti portatori di riarrangiamenti strutturali mediante tecnica FISH. Come mostrato nelle tabelle 3 e 4, la frequenza media di cellule sbilanciate nelle traslocazioni robertsoniane risultata essere pari al 16,66% (range 5,88% - 32,75%), mentre la frequenza media di cellule sbilanciate nelle traslocazioni reciproche risultata essere pari al 62,92% (range 9,95% - 84,44%). Da tali dati si può evidenziare come la percentuale di cellule sbilanciate sia di molto superiore nelle traslocazioni reciproche piuttosto che nelle traslocazioni robertsoniane, come riportato in letteratura (Roux C. et al. 2005; Benet J. Et al., 2005).

Per studiare l'effetto intercromosomico è stato condotto uno studio che coinvolge anche i cromosomi X, Y, 13, 15, 16, 17, 18, 21 e 22, che sono quelli maggiormente correlati all'insorgenza di aborti. I dati ottenuti sono stati rappresentati nelle tabelle 6 e 7 che riportano le frequenze d'aneuploidia, espresse come rapporto percentuale tra il numero delle cellule aneuploidi per cromosoma analizzato, rispetto al numero di cellule totali analizzate, rispetto alla popolazione normale di controllo. Frequenze d'aneuploidia cui corrisponde un valore di $p < 0,001$ indicano differenze fortemente significative.

Le tabelle mostrano chiaramente che alcuni dei cromosomi non coinvolti direttamente nelle traslocazioni, robertsoniane o reciproche, presentano un'elevata frequenza di aneuploidia rispetto alla popolazione normospermica di controllo.

Un'analisi più accurata mostra, infatti, che le frequenze d'aneuploidia totale nel gruppo dei pazienti affetti da traslocazioni robertsoniane rispetto a quello dei pazienti portatori delle traslocazioni reciproche non sono significativamente differenti (3,26% vs 4,92%, $p=0,36$).

Il grafico 1 mostra che il gruppo di pazienti portatori di traslocazione robertsoniana presenta una elevata frequenza di aneuploidia per i cromosomi sessuali (1,49%), per i cromosomi 13 (1,65%), 15 (1,62%), 17 (1,74%), 21 (2,90%) e 22 (1,52%).

Un andamento analogo si riscontra per le traslocazioni reciproche ma con dei valori maggiori rispetto alle robertsoniane per quanto riguarda i gonosomi (1,88% vs 1,49% $p=0,0064$) e per il cromosoma 15 (2,10% vs 1,62% $p=0,0031$). Il cromosoma 21 ha una frequenza di aneuploidia minore rispetto a quella rilevata nelle traslocazioni robertsoniane (1,65% vs 2,90% $p<0,001$).

In particolare l'analisi mostra che i cromosomi sessuali e il cromosoma 21 hanno una frequenza di aneuploidia molto elevata; questo risultato conferma precedenti studi riportati in letteratura (Spriggs et al., 1995; Blanco et al., 1996; Pellestor et al., 1996). L'aumento di disomia per il cromosoma 21 e per i cromosomi sessuali non era specifico per i portatori di riarrangiamenti strutturali ma era stato osservato in tutti i soggetti testati. Questa osservazione era in disaccordo con l'ipotesi di una relazione tra aumento di non-disgiunzione per questi cromosomi e la presenza di riarrangiamenti strutturali, ma è coerente con l'ipotesi che i cromosomi sessuali e il cromosoma 21 potrebbero essere più suscettibili degli altri cromosomi alla non-disgiunzione (F. Pellestor et al., 2001). Dati provenienti da aborti spontanei e nati vivi supportano questa idea (Jacobs, 1992)

I risultati ottenuti dal nostro studio sono in accordo con i dati riportati in letteratura (Anton et al. 2011) i quali dimostrano che le traslocazioni reciproche mostrano un effetto ICE paragonabile a quello delle traslocazioni robertsoniane. Questi risultati possono essere spiegati alla luce del fatto che per le traslocazioni robertsoniane esistono peculiari caratteristiche citogenetiche che riguardano i cromosomi acrocentrici coinvolti in tali riarrangiamenti (i cromosomi acrocentrici, ad esempio, si caratterizzano per la presenza di sequenze alfa-satellite sull'eterocromatina dei bracci cromosomici p polimorfici). Variazioni nelle riorganizzazioni cromosomiche in tali traslocazioni, possono ostacolare il processo di sinapsi tra cromosomi omologhi (Metzler-Guillemain et al. 1999) favorendo così l'appaiamento eterologo con altre regioni prive di sinapsi del genoma. Quest'appaiamento sinaptico eterologo, oltre che rappresentare, come detto in precedenza, un meccanismo di regolazione e di salvataggio per la meiosi (Saadallah Hulten e 1986), può anche derivare dall'esistenza di un certo grado di omologia tra le regioni interessate nell'eterosinapsi stessa. L'eterocromatina che non coinvolge i centromeri dei cromosomi 15 e Y ad esempio, mostra un elevato grado di omologia (Burk et al. 1985) e ciò dipende della frequente associazione osservata tra i complessi sinaptonemali di questi due cromosomi (Metzler-Guillemain et al. 1999). Un certo grado di omologia è stata descritta anche tra le sequenze del braccio cromosomico p di alcuni cromosomi acrocentrici (13, 14, 15, e 21) e tra le regioni subtelomeriche Xp / Yq (Brown et al. 1990; Smeets et al. 1991; Stergianou et al. 1992; Wilkinson and Crolla 1993; Ciccodicola et al. 2000; Kuhl et al. 2001). Questo fenomeno potrebbe anche spiegare alcune delle associazioni osservate tra questi cromosomi nella fase di pachitene (Codina-Pascual et al. 2006). Fino alla fase di pachitene, infatti, la localizzazione dei cromosomi acrocentrici nel nucleo interfase è strettamente legata al nucleolo e questo porta i cromosomi acrocentrici a trovarsi in una posizione di relativa "vicinanza-costretta" (Stahl et al. 1976; Stahl et al. 1991; Schwarzacher e Mosgoeller 2000; Tres 2005). E' stato inoltre descritto che frammenti nucleolari possano avvicinarsi al bivalente XY durante la formazione delle regioni di

ricombinazione omologa e trascrizione, come avviene di solito negli spermatociti dei mammiferi (Tres, 2005) e pertanto la stretta associazione tra i cromosomi acrocentrici e la vicinanza con i gonosomi potrebbe favorire una possibile interazione. Ad ogni modo, l'effetto intercromosomico nelle traslocazioni robertsoniane è ancora oggetto di ricerca.

Il discorso si complica nel caso delle traslocazioni reciproche perché queste coinvolgono diversi cromosomi e punti d'interruzione, rendendo quindi più difficile l'analisi dei fattori cromosomici che promuovono l'effetto intercromosomico. In un lavoro compiuto da Anton e colleghi nel 2008, nel quale sono stati studiati numerosi soggetti portatori di traslocazioni reciproche, si evidenzia che possono essere molti i meccanismi citogenetici alla base di un possibile affetto intercromosomico, tra cui: simmetrie dei tetraivalenti, riorganizzazioni che coinvolgono i cromosomi acrocentrici o la partecipazione alla traslocazione di cromosomi con eterocromatina molto estesa (cromosomi 1, 9 e 16).

Sono stati suddivisi i due gruppi di pazienti portatori delle due tipologie di riarrangiamenti bilanciati per poter analizzare l'effetto ICE in relazione alle caratteristiche del liquido seminale. Come si può evincere dalla tabella 7, la frequenza totale di aneuploidia risulta significativamente maggiore negli OAT severi (7.33 ± 5.10 %, con valori compresi tra 2,32 - 16,13%) rispetto agli OAT moderati (2.67 ± 1.81 %, con valori compresi tra 0,76 – 7,91%).

Questi risultati trovano riscontro nel Grafico 2 ,in cui è possibile osservare come la frequenza di aneuploidia per i 9 cromosomi analizzati, risulta avere valori nettamente superiori nel gruppo degli OAT severi, ad eccezione del cromosoma 21, il quale risulta avere una frequenza di aneuploidia medesima nei due gruppi.

4.3 CONCLUSIONI

L'analisi dei nostri risultati indica che la frequenza di aneuploidia nei portatori di riarrangiamenti cromosomici aumenta significativamente nel gruppo di pazienti OAT severi per tutti i cromosomi rispetto al gruppo degli OAT moderati, eccetto per il cromosoma 21 che ha una elevata frequenza di aneuploidia in entrambi i gruppi. Inoltre, questi risultati supportano l'ipotesi di un effetto intercromosomico che interessa particolarmente i portatori di traslocazione con parametri seminali anormali. L'associazione tra OAT severi e l'aumento di aneuploidia in combinazione con riarrangiamenti strutturali riflette probabilmente importanti disturbi durante la meiosi. Questa condizione dovrebbe essere presa in considerazione in consulenza genetica dalle coppie sterili con un partner di sesso maschile che porta un riarrangiamento cromosomico.

Nel caso di traslocazioni maschili, una delle soluzioni cliniche proposte per individuare preventivamente il tasso d'anomalie cromosomiche a livello degli embrioni generati, è quella d'effettuare un'analisi dei cromosomi sugli spermatozoi (Escudero et al., 2003). E' stata infatti dimostrata una forte correlazione tra la percentuale d'anomalie cromosomiche negli embrioni e negli spermatozoi (Munnè et al., 2004). Lo studio concomitante di altri cromosomi, oltre a quelli direttamente coinvolti nella traslocazione, consente infatti di massimizzare le possibilità di gravidanza nei pazienti portatori, evitando il trasferimento di embrioni aneuploidi, in accordo con quanto descritto da Gianaroli e colleghi nel 2002.

BIBLIOGRAFIA

Anton, E., Blanco, J., Egozcue, J. and Vidal, F. (2004a) Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation $t(13;14)(q10;q10)$. *Hum Reprod* 19:1345–1351.

Anton, E., Vidal, F., Egozcue, J. and Blanco, J. (2004b) Preferential alternate segregation in the common $t(11;22)(q23;q11)$ reciprocal translocation: sperm FISH analysis in two brothers. *Reprod Biomed Online* 9:637–644.

Anton, E., Vidal, F., Egozcue, J. and Blanco, J. (2006) Genetic reproductive risk in inversion carriers. *Fertil Steril* 85:661–666.

Anton, E., Vidal, F. and Blanco, J. (2007) Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers. *Hum Reprod* 22:2088–2092

Anton, E., Blanco, J. and Vidal, F. (2010) Meiotic behavior of three D; G Robertsonian translocations: segregation and interchromosomal effect. *J Hum Genet* 55:541–545

Anton E, Vidal F, Blanco J. Interchromosomal effect analyses by sperm FISH: incidence and distribution among reorganization carriers. *Syst Biol Reprod Med*. 2011 Dec;57(6):268-78. Review. PubMed PMID: 22092077.

Baccetti, B., Capitani, S., Collodel, G., Estenoz, M., Gambera, L. and Piomboni, P. (2002) Infertile spermatozoa in a human carrier of robertsonian translocation 14;22. *Fertil Steril* 78:1127–1130.

Baccetti, B., Collodel, G., Marzella, R., Moretti, E., Piomboni, P., Scapigliati, G., et al. (2005) Ultrastructural studies of spermatozoa from infertile males with Robertsonian translocations and 18, X, Y aneuploidies. *Hum Reprod* 20:2295–2300.

Barbieri M. e Carinci P. "Embriologia" casa editrice Ambrosiana. Bergmann M, Nashan D, Nieschlag E. (1989) Pattern of compartmentation in human seminiferous tubules showing dislocation of spermatogonia. *Cell Tissue Res* 256:183 – 190

Benet J, Oliver-Bonet M, Cifuentes P, Templado C, Navarro J. Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenet Genome Res.* 2005;111(3-4):281-90. Review. PubMed PMID: 16192706.

Bermúdez D, Escalier D, Gallo JM, Viellefond A, Rius F, Pérez de Vargas I, Schrével J. Proacrosin as a marker of meiotic and post-meiotic germ cell differentiation: quantitative assessment of human spermatogenesis with a monoclonal antibody. *J Reprod Fertil.* 1994 Mar;100(2):567-75. PubMed PMID: 8021878.

Bernardini L, Gianaroli L, Fortini D, Conte N, Magli MC, Cavani S, Gaggero G, et al. (2000) Frequency of hyper-, hypohaploid and diploidy in ejaculate, epididymal and testicular germ cells of infertile patients. *Hum Reprod* 15:2165–2172

Blanco, J., Egozcue, J., Clusellas, N. and Vidal, F. (1998) FISH on sperm heads allows the analysis of chromosome segregation and interchromosomal effects in carriers of structural rearrangements: results in a translocation carrier, t(5;8)(q33;q13). *Cytogenet Cell Genet* 83:275–280.

Blanco, J., Egozcue, J. and Vidal, F. (2000) Interchromosomal effects for chromosome 21 in carriers of structural chromosome reorganizations determined by fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei. *Hum Genet* 106:500–505

Bond DJ, Chandley AC (1983) *Aneuploidy. Oxford monographs on medical genetics*, vol 11. Oxford University Press, New York

Bond DJ (1987) Mechanisms of aneuploidy induction. *Mutat Res* 181:257-266

Böckers TM, Nieschlag E, Kreutz MR, Bergmann M. Localization of follicle-stimulating hormone (FSH) immunoreactivity and hormone receptor mRNA in testicular tissue of infertile men. *Cell Tissue Res.* 1994 Dec;278(3):595-600. PubMed PMID: 7850869.

Brinkworth MH, Weinbauer GF, Bergmann M, Nieschlag E. Apoptosis as a mechanism of germ cell loss in elderly men. *Int J Androl.* 1997 Aug;20(4):222-8. PubMed PMID: 9401825.

Brown, W.R., MacKinnon, P.J., Villasante, A., Spurr, N., Buckle, V.J. and Dobson, M.J. (1990) Structure and polymorphism of human telomere-associated DNA. *Cell* 63:119–132

Bugge M, Collins A, Petersen MB, Fisher J, Brandt C, Hertz JM, Tranebjaerg L, De Lozier-blanchet C, Nicolaides P, Brøndum-nielsen K, Morton N, Mikkelsen M (1998). Non-disjunction of chromosome 18. *Human molecular genetics* 7:661-9.

Burk, R.D., Szabo, P., O'Brien, S., Nash, W.G., Yu, L. and Smith, K.D. (1985) Organization and chromosomal specificity of autosomal homologs of human Y chromosome repeated DNA. *Chromosoma* 92:225–233..

Cavallini G, Biagiotti G, Ferraretti AP, Gianaroli L, Vitali G. Medica therapy of oligoasthenospermia associated with left varicocele. BJU Int. 2003 Apr;91(6):513-8. PubMed PMID: 12656905.

Chandley, A.C., Speed, R.M., McBeath, S. and Hargreave, T.B. (1986) A human 9;20 reciprocal translocation associated with male infertility analyzed at prophase and metaphase I of meiosis. Cytogenet Cell Genet 41:145–153.

Chandley AC.; Genetic contribution to male infertility. Hum Reprod. 1998 ;13 Suppl 3:76-83; discussion 84 8.

Chemes H. The phagocytic function of Sertoli cells: a morphological, biochemical, and endocrinological study of lysosomes and acid phosphatase localization in the rat testis. Endocrinology. 1986 Oct;119(4):1673-81. PubMed PMID: 3757907

Chen, Y., Huang, J., Liu, P. and Qiao, J. (2007) Analysis of meiotic segregation patterns and interchromosomal effects in sperm from six males with Robertsonian translocations. J Assist Reprod Genet 24:406–411

Cheng, E.Y., Chen, Y.J., Disteche, C.M. and Gartler, S.M. (1999) Analysis of a paracentric inversion in human oocytes: nonhomologous pairing in pachytene. Hum Genet 105:191–196.

Ciccodicola, A., D'Esposito, M., Esposito, T., Gianfrancesco, F., Migliaccio, C., Miano, M.G., et al. (2000) Differentially regulated and evolved genes in the fully sequenced Xq/Yq pseudoautosomal region. Hum Mol Genet 9:395–401.

Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. Am J Anat. 1963 Jan;112:35-51. PubMed PMID: 14021715.

Codina-Pascual, M., Navarro, J., Oliver-Bonet, M., Kraus, J., Speicher, M.R., Arango, O., et al. (2006) Behaviour of human heterochromatic regions during the synapsis of homologous chromosomes. *Hum Reprod* 21:1490–1497.

Conn CM, Harper JC, Winston RML, Delhanty JDA 1998 Infertility couples with Robertsonian translocations: preimplantation genetic analysis of embryos reveals chaotic cleavage divisions. *Human Genetics* 102, 117–123

Danwers J.G., Wiegant J., Raap A.K. et al. (1992) "Multiple colours by fluorescence in situ hybridization using ratio-labelled DNA probes create a molecular Karyotype". *Hum. Mol. Genet.*, 1, 593-598.

De Braekeleer, M. and Dao, T.N. (1991) Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 6:245–250.

De Kretser, D.M. (1969). Ultrastructural features of human spermiogenesis. *Z.forsch. Mikrosk. Anat.* 98, 477.

Díez-Sánchez C, Ruiz-Pesini E, Montoya J, Pérez-Martos A, Enríquez JA, López-Pérez MJ., Mitochondria from ejaculated human spermatozoa do not synthesize proteins. *FEBS Lett.* 2003 ;553(1-2):205-8.

Epstein CJ (1986) *The consequences of chromosomal imbalance: principles, mechanisms and models.* Cambridge University Press, Cambridge.

Escudero T, Abdelhadi I, Sandalinas M, Munné S 2003 Predictive value of sperm chromosome analysis on the outcome of PGD for translocations. *Fertility and Sterility* 79 (suppl. 3), 1528–1534.

Estop AM, Cieply K, Munne S, Surti U, Wakim A, Feingold E. Is there an interchromosomal effect in reciprocal translocation carriers? Sperm FISH studies. Hum Genet. 2000 May;106(5):517-24. Erratum in: Hum Genet 2000 Jul;107(1):95. PubMed PMID: 10914681.

Evans HJ (1962). Chromosome aberrations induced by ionizing radiations. 13:221-321.

Francavilla S, D'Abrizio P, Rucci N, Silvano G, Properzi G, Straface E, Cordeschi G, Necozone S, Gnessi L, Arizzi M, Ulisse S. Fas and Fas ligand expression in fetal and adult human testis with normal or deranged spermatogenesis. J Clin Endocrinol Metab. 2000 Aug;85(8):2692-700. PubMed PMID: 10946867.

Gabriel-Robez, O., Ratomponirina, C., Dutrillaux, B., Carre-Pigeon, F. and Rumpler, Y. (1986) Meiotic association between the XY chromosomes and the autosomal quadrivalent of a reciprocal translocation in two infertile men, 46,XY,t(19;22) and 46,XY,t(17;21). Cytogenet Cell Genet 43:154–160.

Gersen SL e Keagle MB (eds) (2005). The principles of clinical cytogenetics, 2nd edn. Humana Press, 2005.

*Gianaroli L, Magli C, Ferraretti AP, Munné S 1999 Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. Fertility and Sterility **72**, 837–844*

*Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP 2001a The in vivo and in vitro efficiency and efficacy of PGD for aneuploidy. Molecular and Cellular Endocrinology **183**, S13–S18.*

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP et al. 2001b The role of preimplantation diagnosis for aneuploidy. *Reproductive BioMedicine Online* **4**, 31–36

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munné S, Balicchia B, Escudero T, Crippa A. Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Hum Reprod.* 2002 Dec;17(12):3201-7. PubMed PMID:12456624.

Gianaroli L, Magli C, Fiorentino F et al. 2003 Clinical value of preimplantation genetic diagnosis. *Placenta* **24**, S77–S83

Gianaroli L, Magli MC, Cavallini G, Crippa A, Nadalini M, Bernardini L, Menchini Fabris GF, Voliani S, Ferraretti AP. Frequency of aneuploidy in sperm from patients with extremely severe male factor infertility. *Hum Reprod.* 2005b Aug;20(8):2140-52. Epub 2005 Apr 21. PubMed PMID: 15845594.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP. Sperm and blastomere aneuploidy detection in reproductive genetics and medicine. *J Histochem Cytochem.* 2005a Mar;53(3):261-7. PubMed PMID: 15749998

Griffiths AJF (2004). *An introduction to genetic analysis*, 8th Edition. W.H.Freeman & Co Ltd.

Guichaoua, M.R., Quack, B., Speed, R.M., Noel, B., Chandley, A.C. and Luciani, J.M. (1990) Infertility in human males with autosomal translocations: meiotic study of a 14;22 Robertsonian translocation. *Hum Genet* 86:162–166.

Hassold T, Sherman S, Hunt PA (1995). The origin of trisomy in humans. *Progress in clinical and biological research* 393:1-12.

Hassold T e Hunt P (2001). *To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy* *Nature Reviews Genetics* 2: 280-91.

Hatakeyama, C., Gao, H., Harmer, K. and Ma, S. (2006) *Meiotic segregation patterns and ICSI pregnancy outcome of a rare (13;21) Robertsonian translocation carrier: a case report.* *Hum Reprod* 21:976–979.

Hatasaka HH. *Recurrent miscarriage: epidemiologic factors, definitions, and incidence.* *Clin Obstet Gynecol.* 1994 Sep;37(3):625-34. Review. PubMed PMID:7955649

Hecht F. Hecht BK (1987) *Aneuploidy in humans: dimensions, demography and dangers of abnormal numbers of chromosomes.* In: Vig BK, Sandberg AA (eds) *Aneuploidy. Part A: Incidence and etiology.* Alan R Liss, New York, pp 9-49

Hecht F. and Patil S.R. (1977) *Interchromosomal effect in man.* *Clin. Genet.* 12, 189-190.

Heller CH, Clermont Y. *Kinetics of the germinal epithelium in man.* *Recent Prog Horm Res.* 1964;20:545-75. PubMed PMID: 14285045.

Holstein AF, Roosen-Runge EC(1981)*Atlas of a human spermatogenesis.* Grosse, Berlin.

Holstein AF, Schirren C, Roosen-Runge EC (1988) *Illustrated pathology of human spermatogenesis.* Grosse, Berlin

Honda, H., and Mihar, N., Ohashi, Y., Honda, N., Hara, T. and Ohama, K. (1999) *Analysis of segregation and aneuploidy in two reciprocal translocation carriers,*

t(3;9)(q26.2;q32) and t(3;9)(p25; q32), by triple-color fluorescence in situ hybridization. Hum Genet 105:428–436

Hook EB (1985) The impact of aneuploidy upon public health: mortality and morbidity associated with human chromosome abnormalities. In: Dellarco VL, Voytek PE, Hollaender A (eds) Aneuploidy: etiology and mechanisms. Plenum, New York, pp 7-33

Hook, E.B. and Hamerton, J.L. (1977). The frequency of chromosome abnormalities detected in consecutive newborn studies/differences between studies/results by sex and by severity of phenotypic involvement. In Hook, E.B. and Porter, J.H. (eds), Population Cytogenetics. Academic Press, New York, p.66-79.

Joyce, E.F. and McKim, K.S. (2010) Chromosome axis defects induce a checkpoint-mediated delay and interchromosomal effect on crossing over during Drosophila meiosis. PLoS Genet 6:e1001059. doi:10.1371/journal.pgen.1001059

Joyce, E.F. and McKim, K.S. (2011) Meiotic checkpoints and the interchromosomal effect on crossing over in Drosophila females. Fly (Austin) 5:134–140.

Johannisson, R., Lohrs, U., Wolff, H.H. and Schwinger, E. (1987) Two different XY-quadrivalent associations and impairment of fertility in men. Cytogenet Cell Genet 45:222–230.

Juchniuk de Vozzi, M.S., Santos, S.A., Pereira, C.S., Cuzzi, J.F., Laureano, L.A., Franco, J.G., Jr. et al. (2009) Meiotic segregation and interchromosomal effect in the sperm of a double translocation carrier: a case report. Mol Cytogenet 2:24.

Kearns W.G. and Pearson P.L. (1994) "Fluorescent in situ hybridization using chromosome-specific DNA libraries". *Meth. Mol. Biol.*, 33, 15-22.

Kekesi, A., Erdei, E., Torok, M., Dravucz, S. and Toth, A. (2007) Segregation of chromosomes in spermatozoa of four Hungarian translocation carriers. *Fertil Steril* 88:212 e215–211.

Kierszenbaum AL. Genomic imprinting and epigenetic reprogramming: unearthing the garden of forking paths. *Mol Reprod Dev.* 2002 Nov;63(3):269-72.

Kuhl, H., Rottger, S., Heilbronner, H., Enders, H. and Schempp, W. (2001) Loss of the Y chromosomal PAR2-region in four familial cases of satellited Y chromosomes (Yqs). *Chromosome Res* 9:215–222.

Lamb NE, Feingold E, Savage A, Avramopoulos D, Freeman S, Gu Y, Hallberg A, Hersey J, Karadima G, Pettay D, Saker D, Shen J, Taft L, Mikkelsen M, Petersen MB, Hassold T, Sherman SL (1997). Characterization of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal nondisjunction of chromosome 21. *Human molecular genetics* 6:1391-9.

Leblond CP, Clermont Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci.* 1952 Nov 20;55(4):548-73. PubMed PMID: 13139144.

Lee RM, Silver RM. Recurrent pregnancy loss: summary and clinical recommendations. *Semin Reprod Med.* 2000;18(4):433-40. Review. PubMed PMID:11355802.

Lejeune, J. (1963) Autosomal Disorders. *Pediatrics* 32:326–337.

Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM, Lipshultz LI, Kim ED. *In situ end-labeling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. Fertil Steril.* 1997 Dec;68(6):1065-9. PubMed PMID: 9418698.

Malan V, Vekemans M, Turleau C (2006). *Chimera and other fertilization errors. Clinical genetics* 70:363-373.

Márquez C, Sandalinas M, Bahçe M et al. 2000 *Chromosomal abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. Reproductive BioMedicine Online* 1, 17–27
Martini, E., von Bergh, A.R., Coonen, E., de Die-Smulders, C.E., Hopman, A.H., Ramaekers, F.C., et al. (1998) *Detection of structural abnormalities in spermatozoa of a translocation carrier t(3;11) (q27.3;q24.3) by triple FISH. Hum Genet* 102:157–165.

Mau-Holzmann, U.A. (2005) *Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. Cytogenet Genome Res* 111:317–336

Mcfadden DE e Friedman JM (1997). *Chromosome abnormalities in human beings. Mutation research* 396:129-40.

Mercier, S., Morel, F., Fellman, F., Roux, C. and Bresson, J.L. (1998) *Molecular analysis of the chromosomal equipment in spermatozoa of a 46, XY, t(7;8) (q11.21;cen) carrier by using fluorescence in situ hybridization. Hum Genet* 102:446–451.

Metzler-Guillemain, C., Mignon, C., Depetris, D., Guichaoua, M.R. and Mattei, M.G. (1999) *Bivalent 15 regularly associates with the sex vesicle in normal male meiosis. Chromosome Res* 7:369–378.

Mieusset R, Bujan L. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *Int J Androl*. 1995 Aug;18(4):169-84. Review. PubMed PMID: 7591190

Mikhaail-Philips, M.M., Ko, E., Chernos, J., Greene, C., Rademaker, A. and Martin, R.H. (2004) Analysis of chromosome segregation in sperm from a chromosome 2 inversion heterozygote and assessment of an interchromosomal effect. *Am J Med Genet A* 127:139–143.

Mikhaail-Philips, M.M., McGillivray, B.C., Hamilton, S.J., Ko, E., Chernos, J., Rademaker, A., et al. (2005) Unusual segregation products in sperm from a pericentric inversion 17 heterozygote. *Hum Genet* 117:357–365.

Morel, F., Roux, C. and Bresson, J.L. (2001) FISH analysis of the chromosomal status of spermatozoa from three men with 45,XY,der (13;14)(q10;q10) karyotype. *Mol Hum Reprod* 7:483–488.

Morel, F., Douet-Guilbert, N., Roux, C., Tripogney, C., Le Bris, M.J., De Braekeleer, M., et al. (2004) Meiotic segregation of a t(7;8) (q11.21;cen) translocation in two carrier brothers. *Fertil Steril* 81:682–685

Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Herry A, Amice V, Amice J, De Braekeleer M. Meiotic segregation of translocations during male gametogenesis. *Int J Androl*. 2004 Aug;27(4):200-12. Review. PubMed PMID: 15271199.

Munné S, Alikani M, Tomkin G et al. 1995 Embryo morphology, developmental rates and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertility and Sterility* 64, 382–391.

Munné S, Morrison L, Fung J et al. 1998a Spontaneous abortions are reduced after pre-conception diagnosis of translocations. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 15, 290–296.

Munné S, Magli C, Cohen J et al. 1999 Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Human Reproduction* **14**, 2191–2199.

Munné S, Sandalinas M, Escudero T et al. 2000a Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertility and Sterility* **73**, 1209–1218

Munné S, Sepulveda S, Balmaceda J et al. 2000b Selection of the most common chromosome abnormalities in oocytes prior to ICSI. *Prenatal Diagnosis* **20**, 582–586.

Munné S, Escudero T, Colls P, Xuezhong Z, Oter M, Garrisi M, Barnes F, Zouves C, Werlin L, Magli C, Cohen J. Predictability of preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy and translocations on prospective attempts. *Reprod Biomed Online*. 2004 Dec;9(6):645-51.

Munné S, Fragouli E, Colls P, Katz-Jaffe M, Schoolcraft W, Wells D. Improved detection of aneuploid blastocysts using a new 12-chromosome FISH test. *Reprod Biomed Online*. 2010 Jan;20(1):92-7.

Navarro, J., Vidal, F., Benet, J., Templado, C., Marina, S. and Egozcue, J. (1991) XY-trivalent association and synaptic anomalies in a male carrier of a Robertsonian t(13;14) translocation. *Hum Reprod* 6:376–381.

Oliver-Bonet, M., Navarro, J., Codina-Pascual, M., Abad, C., Guitart, M., Egozcue, J., et al. (2004) From spermatocytes to sperm: meiotic behaviour of human male reciprocal translocations. *Hum Reprod* 19:2515–2522.

Oliver-Bonet, M., Benet, J., Sun, F., Navarro, J., Abad, C., Liehr, T., et al. (2005) *Meiotic studies in two human reciprocal translocations and their association with spermatogenic failure. Hum Reprod* 20:683–688.

Rives, N., Jarnot, M., Mousset-Simeon, N., Joly, G. and Mace, B. (2003) *Fluorescence in situ hybridisation (FISH) analysis of chromosome segregation and interchromosomal effect in spermatozoa of a reciprocal translocation t(9,10)(q11;p11.1) carrier. J Hum Genet* 48:535–540.

Pellestor F. *Analysis of meiotic segregation in a man heterozygous for a 13;15 Robertsonian translocation and a review of the literature. Hum Genet.* 1990 Jun;85(1):49-54. PubMed PMID: 2358303.

Pellestor, F., Imbert, I., Andreo, B. and Lefort, G. (2001) *Study of the occurrence of interchromosomal effect in spermatozoa of chromosomal rearrangement carriers by fluorescence in-situ hybridization and primed in-situ labelling techniques. Hum Reprod* 16:1155–1164.

Pellestor, F., Puechberty, J., Weise, A., Lefort, G., Anahory, T., Liehr, T., et al. (2011) *Meiotic segregation of complex reciprocal translocations: direct analysis of the spermatozoa of a t(5;13;14) carrier. Fertil Steril* 95:2433.e17–e22.

Pinkel D., Landegent J., Collins C. et al. (1988) *“Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4”. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 9138-9142

Rousseaux, S., Chevret, E., Monteil, M., Cozzi, J., Pelletier, R., Delafontaine, D., et al. (1995a) *Sperm nuclei analysis of a Robertsonian t(14q21q) carrier, by FISH, using three plasmids and two YAC probes. Hum Genet* 96:655–660.

Rousseaux, S., Chevret, E., Monteil, M., Cozzi, J., Pelletier, R., Devillard, F., et al. (1995b) *Meiotic segregation in males heterozygote for reciprocal translocations: analysis of sperm nuclei by two and three colour fluorescence in situ hybridization*. *Cytogenet Cell Genet* 71:240–246.

Roux C, Tripogney C, Morel F, Joanne C, Fellmann F, Clavequin MC, Bresson JL. *Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocation carriers*. *Cytogenet Genome Res*. 2005;111(3-4):291-6. Review. PubMed PMID: 16192707.

Reid T., Landes G., Dackowski W., et al. (1992a) "Multicolor fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of probe sets for chromosome 13, 18, 21, X and Y in uncultured amniotic fluid cells". *Hum. Mol. Genet.*, 1, 307-313.

Rosati P. e Colombo R. "Istologia" IV Ed. (2001) EdiErmes.

Ross LO, Rankin S, Shuster MF, Dawson DS (1996). *Effects of homology, size and exchange of the meiotic segregation of model chromosomes in saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 142:79-89.

Saadallah, N. and Hulten, M. (1986) *EM investigations of surface spread synaptonemal complexes in a human male carrier of a pericentric inversion inv(13)(p12q14): the role of heterosynapsis for spermatocyte survival*. *Ann Hum Genet* 50 (Pt 4):369–383

Schlatt S, Weinbauer GF. *Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen as a tool to study cell proliferation in rodent and primate testes*. *Int J Androl*. 1994 Aug;17(4):214-22. PubMed PMID: 7995658 Singh J, O'Neill C, Handelsman DJ. *Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-*

deficient (*hpg*) mice. *Endocrinology*. 1995 Dec;136(12):5311-21. PubMed PMID: 7588276.

Schwarzacher, H.G. and Mosgoeller, W. (2000) Ribosome biogenesis in man: current views on nucleolar structures and function. *Cytogenet Cell Genet* 91:243–252.

Sears DD, Hegemann JH, Shero JH, Hieter P (1995). Cis-acting determinants affecting centromere function, sister-chromatid cohesion and reciprocal recombination during meiosis in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 139:1159–73.

Setchell BP. The Parkes Lecture. Heat and the testis. *J Reprod Fertil*. 1998 Nov;114(2):179-94. Review. PubMed PMID: 10070346.

Smeets, D.F.C.M., Merkx, G.F.M. and Hopman, A.H.M. (1991) Frequent Occurrence of Translocations of the Short Arm of Chromosome- 15 to Other D-Group Chromosomes. *Hum Genet* 87:45–48.

Stahl, A., Hartung, M., Vagner-Capodano, A.M. and Fouet, C. (1976) Chromosomal constitution of nucleolus-associated chromatin in man. *Hum Genet* 35:27–34.

Stahl, A., Wachtler, F., Hartung, M., Devictor, M., Schofer, C., Mosgoller, W., et al. (1991) Nucleoli, nucleolar chromosomes and ribosomal genes in the human spermatocyte. *Chromosoma* 101:231–244.

Stergianou, K., Gould, C.P., Waters, J.J. and Hulten, M. (1992) High Population Incidence of the 15p Marker D15z1 Mapping to the Short Arm of One Homolog-14. *Hum Genet* 88:364.

Steger K, Aleithe I, Behre H, Bergmann M. The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen. Mol Hum Reprod. 1998 Mar;4(3):227-33. PubMed PMID: 9570268

Steger K. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. Anat Embryol (Berl). 1999 Jun;199(6):471-87. Review. PubMed PMID: 10350128.

Steger K. Haploid spermatids exhibit translationally repressed mRNAs. Anat Embryol (Berl). 2001 May;203(5):323-34. Review. PubMed PMID: 11411307.

Stern, C., Pertile, M., Norris, H., Hale, L. and Baker, H.W.G. (1999) Chromosome translocations in couples with in vitro fertilization implantation failure. Hum. Reprod., 14, 2097–2101.

Templado C, Márquez C, Munné S, Colls P, Martorell MR, Ciepły K, Benet J, Van Kirk V, Navarro J, Estop AM. An analysis of human sperm chromosome aneuploidy. Cytogenet Cell Genet. 1996;74(3):194-200. PubMed PMID: 8941373.

Tesarik J, Greco E, Cohen-Bacrie P, Mendoza C. Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. Mol Hum Reprod. 1998 Aug;4(8):757-62. PubMed PMID: 9733432.

Tesarik J, Mendoza C, Greco E. The effect of FSH on male germ cell survival and differentiation in vitro is mimicked by pentoxifylline but not insulin. Mol Hum Reprod. 2000 Oct;6(10):877-81. PubMed PMID: 11006315.

Trask B.J. (1991) "DNA sequence localization in metaphase and interphase cells by fluorescence in situ hybridization". *Meth. Cell Biol.*, 35, 3-35.

Tres, L.L. (2005) XY chromosomal bivalent: nucleolar attraction. *Mol Reprod Dev* 72:1–6.

Van Hummelen P., Lowe X.R. and Wyrobek A.J. (1996) "Simultaneous detection of structural and numerical chromosomes abnormalities in sperm of healthy men by multicolor fluorescence in situ hybridization". *Hum. Genet.*, 98, 608-615.

Vialard, F., Delanete, A., Clement, P., Simon-Bouy, B., Aubriot, F.X. and Selva, J. (2007) Sperm chromosome analysis in two cases of paracentric inversion. *Fertil Steril* 87:418 e411–415.

Vozdova, M., Oracova, E., Horinova, V. and Rubes, J. (2008) Sperm fluorescence in situ hybridization study of meiotic segregation and an interchromosomal effect in carriers of t(11;18). *Hum Reprod* 23:581–588.

Vozdova, M., Oracova, E., Musilova, P., Kasikova, K., Prinosilova, P., Gaillyova, R., et al. (2011b) Sperm and embryo analysis of similar t(7;10) translocations transmitted in two families. *Fertil Steril* 96:e66–e70.

Werlin L, Rodi I, DeCherney A et al. 2003 Preimplantation genetic diagnosis (PGD) as both a therapeutic and diagnostic tool in assisted reproductive technology. *Fertility and Sterility* 80,467–468

Wiland, E., Midro, A.T., Panasiuk, B. and Kurpisz, M. (2007) The analysis of meiotic segregation patterns and aneuploidy in the spermatozoa of father and son with translocation t(4;5)(p15.1;p12) and the prediction of the individual probability rate for unbalanced progeny at birth. *J Androl* 28:262–272.

Wilkinson, T.A. and Crolla, J.A. (1993) Molecular cytogenetic characterization of three familial cases of satellited Y chromosomes. *Human genetics* 91:389–391

Willard H.F. and Way W.S. (1987) “Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA”. *Trends Genet.*, 3, 192-198.

William J. Germann, Cindy L. Stanfield (2006) “Fisiologia” II Ed. EdiSES

Wistuba J, Schrod A, Greve B, Hodges JK, Aslam H, Weinbauer GF, Luetjens CM. Organization of seminiferous epithelium in primates: relationship to spermatogenic efficiency, phylogeny, and mating system. *Biol Reprod.* 2003 Aug;69(2):582-91. Epub 2003 Apr 16. PubMed PMID: 12700190

Wolff. S (1961). Radiation genetics. In: Errera M, Ed and Forssberg, Arne Gunnar, 1904- Joint E., editors. *Mechanisms in Radiobiology*. New York: Academic Press. p 419-475.

Xia W, Wong EW, Mruk DD, Cheng CY. TGF-beta3 and TNFalpha perturb blood-testis barrier (BTB) dynamics by accelerating the clathrin-mediated endocytosis of integral membrane proteins: a new concept of BTB regulation during spermatogenesis. *Dev Biol.* 2009 Mar 1;327(1):48-61. Epub 2008 Dec 7. PubMed PMID: 19103189; PubMed Central PMCID: PMC2758298.

